

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Effet de l'inhibition de l'expression de p53 sur l'apoptose induite par l'étoposide en conditions de normoxie et d'hypoxie

Ronvaux, Marie

Award date:
2007

Awarding institution:
Université de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



**FACULTÉS UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR**

Faculté des Sciences

**Effet de l'inhibition de l'expression de p53 sur l'apoptose induite par
l'étoposide en conditions de normoxie et d'hypoxie**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
licencié en Sciences biologiques**

Marie RONVAUX

Juin 2007

Remerciements

Il est temps de remercier toutes les personnes ayant aidé de près ou de loin à l'élaboration de ce mémoire. Tout d'abord, je tiens à remercier ma promotrice, Carine Michiels, pour son suivi, ses nombreuses corrections et ses conseils tout au long du travail en laboratoire.

Je remercie également mon tuteur, Jean-philippe Cosse, pour ne pas m'avoir larguée dans ce labo. Merci pour sa patience au cours des expériences réalisées, mais aussi pour ses corrections et son aide.

Merci à toute l'équipe HIF pour leur gentillesse et leurs conseils, et plus particulièrement, merci à Lionel pour m'avoir aidé lors des problèmes informatiques rencontrés ! Si c'était à refaire, je choiserais sans aucun doute cette équipe !

Je remercie également les autres mémorants, Audrey, Sophie, Dorothy, Gwen, Guillaume, Hélène, Laurent et Jacques, pour les moments de détente passés dans ce petit local qui sent si bon la cigarette. De façon plus générale, merci aussi à mes autres amis biologistes pour ces quatre années passées ensemble. Je pense par exemple à Géraldine et Stéphanie avec qui j'ai passé de très bons moments, aux autres étudiants de bio humaine que j'apprécie beaucoup ou à Charles que je remercie pour toutes ces sorties en roller et pour toutes ces cloches...

Ma famille m'a également beaucoup aidé au cours de ces quelques mois. Tout d'abord, je remercie Gilles, sans qui je n'aurais jamais commencé ces études, mais aussi Virginie qui m'a aidée à distance... Je remercie également mes parents pour avoir eu confiance en moi, c'est grâce à eux que j'en suis là ! Un grand merci à ma mère qui a corrigé certaines parties de ce mémoire en ne comprenant pas grand-chose de ce qu'elle lisait !

Pour finir, je remercie tous ceux que j'ai oublié, toutes ces personnes qui m'ont fait passer de bons moments durant ces quatre années.

Effet de l'inhibition de l'expression de p53 sur l'apoptose induite par l'étoposide en condition de normoxie et d'hypoxie

Ronvaux Marie

Résumé

Lors du développement d'une tumeur cancéreuse, une zone hypoxique se forme au centre dû à la croissance rapide des cellules tumorales. Ce centre hypoxique engendre une série de réponses au sein de la tumeur, comme par exemple la stabilisation et l'activation du facteur de transcription HIF-1 qui permet une adaptation à long terme à ces conditions. De plus, ce centre hypoxique procure aux cellules tumorales une résistance aux traitements de chimiothérapies. En effet, il a précédemment été montré au laboratoire que l'hypoxie protège les cellules d'un hépatocarcinome humain (HepG2) contre l'apoptose induite par l'étoposide, agent chimiothérapeutique fréquemment utilisé dans le traitement des cancers. Néanmoins, le mécanisme de cette protection reste inconnu.

Lors de ce travail, l'hypothèse selon laquelle l'hypoxie protège les cellules de l'apoptose induite par l'étoposide en diminuant le niveau de la protéine p53 a été testée. L'implication de p53 dans l'apoptose induite par l'étoposide fut d'abord vérifiée. Ensuite, l'effet de l'inhibition de l'expression de p53 sur l'apoptose induite par l'étoposide fut observé en normoxie et en hypoxie. Cela nous a permis de confirmer l'existence de la protection procurée par l'hypoxie, mais également d'observer le rôle de p53 dans cette protection. Finalement, l'expression d'un gène cible de p53 codant pour une protéine pro-apoptotique fut inhibée afin d'identifier par quel(s) effecteur(s) p53 engendre l'apoptose en présence d'étoposide. La protéine Bak fut choisie car il a été observé au cours de ces expériences que son expression subit les mêmes variations que celle des gènes cibles de p53. Nous avons donc pu confirmer ces observations.

Les conclusions de cette étude montrent premièrement que c'est effectivement via p53 que l'étoposide induit l'apoptose. Deuxièmement, il semble que l'hypoxie protège les cellules HepG2 de l'apoptose induite par l'étoposide via une diminution de p53. Le mécanisme par lequel l'hypoxie inhibe p53 reste encore inconnu. Enfin, Bak semble être encodé par un gène cible de p53 et il serait dans ce cas un des effecteurs de l'apoptose induite par p53. La protection pourrait alors s'effectuer via une diminution de l'expression des effecteurs pro-apoptotiques de p53, donc par une diminution de Bak.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Juin 2007

Promoteur : Carine Michiels

Liste des abréviations

ABC	ATP Binding Cassette
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AIF	Apoptosis Inducing Factor
Akt/PKB	Protéine Kinase B
ALDOA	Aldolase
ANT	Adenine Nucleotide Translocase
AP-1	Activated protein-1
Apaf-1	Apoptosis protease-activating factor-1
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARNT	Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator
ATM	Ataxia Telangiectasia-Mutated
ATP	Adénosine Triphosphate
ATR	ATM and Rad 3 related
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BH	Bcl2 Homology domain
bHLH	Basix-Helix-Loop-Helix
BIR	Baculoviral IAP Repeat
BSA	Bovin Serum Albumin
CAD	Caspase Activated-DNAse
CARD	Caspase Recruitment Domain
Caspase	CysteinyI aspartate-specific protease
CBP	CREB Binding Protein
Ct	Cycle threshold
D.O.	Densité optique
DD	Death Domain
DED	Death Effector Domain
DIABLO	Direct IAP Binding protein with Low pI
DISC	Death Inducing Signalling Complex
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Diméthylsulfoxyde
dNTP	Désoxynucléotide triphosphate
EDTA	Ethylène Diamine Tétra Acétique
EGF	Epidermal Growth Factor
endoG	Endonucléase G
EPO	Erythropoïétine
Etop	Etoposide
FADD	Fas-Associated Death Domain protein

Fas-L	Ligand de Fas
FLIP	Flice like Inhibitory Protein
GAPDH	GlycérAldehyde Phosphate Deshydrogénase
GLUT-1	Glucose Transporter-1
GLUT-3	Glucose Transporter-3
He	Hypoxie étoposide
HIF-1	Hypoxia Inducible Factor-1
HKG	House Keeping Gene
HLH	Helix-Loop-Helix
HRE	Hypoxia Responsive Element
Hx	Hypoxie
IAP	Inhibitor of Apoptosis Proteins
iCAD	Inhibitor of CAD
IF	Immunofluorescence
IGF-2	Insulin-like Growth Factor-2
kDA	kiloDalton
mA	milli Ampère
Mcl-1	Myeloid cell lymphome-1
MDR1	Multi Drug Resistance 1
Ne	Normoxie étoposide
NF-κB	Nuclear Factor kappa B
NLS	Nuclear Localisation Sequence
NO	Monoxyde d'azote
Nx	Normoxie
ODD	Oxygen-dependent Degradation Domain
PARP	Poly-ADP-Ribose Polymérase
PAS	Per ARNT Sim
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFA	Paraformaldéhyde
PHD	Prolyl Hydroxylase
PI₃K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PIB	Phosphatase Inhibitor Buffer
PIC	Protease Inhibitor Cocktail
PTP	Permeability Transition Pore
PVDF	PolyVinylidène DiFluoride
pVHL	Protéine von Hippel-Lindau
RISC	RNA Induced Silencing Complex
RNA-i	RNA Interférent
ROS	Reactive Oxygen Species
rpm	Rotations par minute

RT	Reverse Transcription
SDS	Sodium Dodécyl Sulfate
si-RNA	small interferant RNA
Smac	Second mitochondrial activator of caspase
TAD C	Transactivation Domain C-terminal
TAD N	Transactivation Domain N-terminal
TBS	Tris Buffer Saline
t-Bid	truncated Bid
TBP	TATA box Binding Protein
TGF-β	Transforming Growth Factor- β
TNF-α	Tumor Necrosis Factor α
TNF-R	Récepteur au TNF
TRADD	TNF-R Associated Death Domain
TRAF-2	TNFR-Associated Factor 2
VDAC	Voltage Dependent Anion Channel
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

<u>AVANT-PROPOS</u>	1
<u>1. INTRODUCTION</u>	2
<u>1. L'apoptose</u>	2
<u>1.1 Introduction</u>	2
<u>1.2 Mécanisme</u>	2
<u>1.2.1 L'initiation</u>	2
<u>1.2.1.1 Voie intrinsèque</u>	3
<u>1.2.1.2 Voie extrinsèque</u>	3
<u>1.2.2 L'intégration</u>	4
<u>1.2.2.1 Perméabilisation de la mitochondrie</u>	4
<u>1.2.2.2 Formation de l'apoptosome</u>	5
<u>1.2.3 L'exécution</u>	6
<u>1.2.3.1 Mécanismes d'action et substrats des caspases</u>	6
<u>1.2.3.2 Régulation de l'activité des caspases</u>	7
<u>1.3 La protéine p53</u>	7
<u>1.3.1 Introduction</u>	7
<u>1.3.2 Mécanisme de régulation de p53</u>	8
<u>1.3.3 Effets de p53</u>	8
<u>2. L'hypoxie</u>	9
<u>2.1 Introduction</u>	9
<u>2.2 Réponses à court terme à l'hypoxie</u>	9
<u>2.3 Réponses à long terme à l'hypoxie</u>	10
<u>2.3.1 Adaptation via le facteur de transcription HIF-1</u>	10
<u>2.3.1.1 Structure de HIF-1</u>	10
<u>2.3.1.2 Régulation de l'activité de HIF-1</u>	10
<u>2.3.1.3 Effets de HIF-1</u>	11
<u>3. L'hypoxie et l'apoptose dans le cancer</u>	12
<u>3.1 Apparition des cancers</u>	12
<u>3.1.1 Mutation dans les cellules tumorales</u>	12
<u>3.1.2 L'hypoxie tumorale</u>	13
<u>3.2 Stratégies de la chimiothérapie</u>	13
<u>3.3 Résistance aux traitements due à l'hypoxie</u>	14
<u>4. Objectifs</u>	16
II. MATÉRIEL ET MÉTHODES	17
1. Culture cellulaire	17
1.1 Matériel :	17
1.2 Méthode :	17
2. Incubation sous hypoxie	17
2.1 Matériel :	17
2.2 Méthode :	17

3. Immunofluorescence	18
3.1 Principe :	18
3.2 Matériel :	18
3.3 Méthode :	18
4. Extraction protéique totale	19
4.1 Matériel :	19
4.2 Méthode :	19
5. Dosage des protéines par la méthode de Bradford.....	19
5.1 Matériel :	19
5.2 Méthode :	19
6. Western Blot	20
6.1 Principe :	20
6.2 Préparation des échantillons :	20
6.3 Migration :	20
6.4 Transfert :	21
6.5 Blocking et révélation	21
7. Dosage de l'activité de la caspase 3	22
7.1 Principe	22
7.2 Matériel	22
7.3 Méthode	22
8. Transfection de siRNA	23
8.1 Introduction	23
8.2 Matériel :	23
8.3 Méthode :	24
9. Extraction d'ARN total	24
9.1 Matériel :	24
9.2 Méthode :	24
10. La PCR en temps réel.....	25
10.1 Principe :	25
10.2 Rétro-transcription :	25
10.3 PCR en temps réel :	25
11. Microdamiers à ADN (DualChip Human Apoptosis)	26
11.1 Principe :	26
11.2 Rétro-transcription :	26
11.3 Hybridation sur les microdamiers.....	27

III. RÉSULTATS ET DISCUSSION..... 28

<u>1. Etude de l'effet de l'inhibition de l'expression de p53 sur l'apoptose induite par l'étoposide en hypoxie et en normoxie</u>.....	28
<u>1.1 Mise au point de l'inhibition de l'expression de p53</u>.....	28

1.1.1	Introduction	28
1.1.2	Evaluation de l'inhibition de l'expression de p53 par marquage en immunofluorescence	29
1.1.3	Evaluation de l'extinction de p53 par Western-Blot	30
1.1.4	Evaluation de l'extinction de l'ARNm de p53 par PCR en temps réel et microdamiers « Human apoptosis »	30
1.1.5	Conclusion	31
1.2	Effet de l'extinction de p53 sur l'expression de ses effecteurs	32
1.2.1	Introduction	32
1.2.2	Effet de l'extinction de p53 sur l'expression de ses gènes cibles	32
1.2.2.1	Evaluation par microdamiers « Human Apoptosis »	32
1.2.2.2	Evaluation par PCR en temps réel	33
1.2.3	Effet de l'extinction de p53 sur l'expression des protéines encodées par ses gènes cibles	34
1.3	Etude de l'effet de l'extinction de p53 sur l'apoptose induite par l'étoposide, en normoxie et en hypoxie	35
1.3.1	Introduction	35
1.3.2	Evaluation de l'abondance de p53	36
1.3.3	Evaluation par un dosage de l'activité de la caspase 3	36
1.3.4	Evaluation du clivage de la protéine PARP par Western-Blot	37
1.3.5	Conclusion	38
2.	Etude de l'effet de l'inhibition de la protéine pro-apoptotique Bak sur l'apoptose induite par l'étoposide	38
2.1	Introduction	38
2.2	Mise au point de l'inhibition de l'expression de Bak	39
2.2.1	Evaluation par Western-Blot	39
2.2.2	Evaluation par PCR en temps réel	40
2.3	Effet de l'extinction de Bak sur l'apoptose induite par l'étoposide, en normoxie et en hypoxie	40
2.3.1	Evaluation par dosage de l'activité de la caspase 3	40
2.3.2	Evaluation par Western-Blot	41
2.4	Conclusion	42
IV.	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	43
V.	BIBLIOGRAPHIE	
VI.	ANNEXES	

Avant-propos

Le cancer est sans nul doute la maladie du 21^e siècle. Effectivement, plus de 30% de la population sera un jour atteint d'un cancer, quel qu'il soit. Heureusement, le traitement de cette maladie est de plus en plus efficace, c'est pourquoi le cancer n'est plus la maladie incurable qu'elle était il y a quelques années. Malgré de nombreux facteurs de risques, comme l'alcool, la cigarette, une exposition excessive au soleil..., le cancer reste une maladie provoquée par le vieillissement. En effet, cette maladie apparaît suite à une accumulation de mutations dans l'ADN. En temps normal, il existe des mécanismes de réparation de l'ADN mais avec l'âge, il arrive que certaines mutations subsistent, ce qui favorise l'apparition d'une tumeur cancéreuse. Ces mutations ont différents effets selon le gène qu'elles concernent. Une mutation dans un gène suppresseur de tumeur aura pour effet d'inhiber l'action de la protéine encodée par ce gène, tandis qu'une mutation dans un gène impliqué dans la régulation de la prolifération cellulaire (proto-oncogène) aura pour effet d'augmenter l'action de la protéine concernée.

Les traitements mis en œuvre pour éliminer les cellules tumorales sont multiples. La stratégie thérapeutique consiste le plus souvent à combiner la radiothérapie à la chimiothérapie pour provoquer la mort des cellules cancéreuses par apoptose. Dans le cas de tumeurs solides, une opération chirurgicale peut être envisagée. Malgré cela, une résistance est apparue aux radiothérapies et chimiothérapies, notamment due à une zone hypoxique au centre de la tumeur. Cette hypoxie protège les cellules tumorales de l'apoptose induite par la chimiothérapie, par exemple.

Afin de mieux comprendre par quel mécanisme cette protection a lieu, nous avons étudié l'effet de l'inhibition du facteur de transcription p53 sur l'apoptose induite par l'étoposide, un agent utilisé en chimiothérapie. La protéine p53 a été choisie car elle est le « gardien du génome », c'est-à-dire qu'elle est activée en réponse à des dommages à l'ADN, en l'occurrence les mêmes qui sont provoqués par l'étoposide. Son implication dans l'apoptose induite par l'étoposide devait donc être vérifiée.

La première partie de cette introduction décrira le processus de mort cellulaire programmée (apoptose) et le rôle de p53. La deuxième partie concernera les réponses à l'hypoxie, et pour finir, une relation sera faite entre l'apoptose et l'hypoxie dans le développement des tumeurs.

1. Introduction

1. L'apoptose

1.1 Introduction

L'apoptose, ou mort cellulaire programmée, est un processus par lequel une cellule se suicide. Ce mécanisme est nécessaire pour maintenir l'homéostasie tissulaire, contrôler la réponse immunitaire ou encore durant le développement embryonnaire. Cependant, trop d'apoptose engendre des maladies neurodégénératives tandis que trop peu provoque des cancers ou des maladies auto-immunes ; c'est pour cette raison qu'une bonne régulation est nécessaire.

Le nématode *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) fut le premier modèle utilisé pour étudier l'apoptose. Son avantage est que ce sont toujours les mêmes 131 cellules sur les 1090 qui meurent. Ce modèle a permis de mieux comprendre ce mécanisme et plusieurs parallélismes ont été faits avec l'apoptose dans une cellule humaine (Cory and Adams 2002).

Quoiqu'il en soit, l'apoptose n'est pas la seule forme de mort cellulaire. Une cellule peut également mourir par nécrose, ce qui correspond à un éclatement de la cellule (**voir figure 1**). La nécrose se produit quand la cellule ne sait plus rien faire pour s'adapter face à un froid / une chaleur extrême, un choc osmotique... Le contenu cellulaire est déversé (y compris les hydrolases et les lysosomes), ce qui engendre une réaction inflammatoire. Contrairement à l'apoptose, ce processus n'est pas du tout régulé et arrive de façon soudaine. En revanche, l'apoptose est une mort cellulaire « propre » car il y a formation de corps apoptotiques qui sont ensuite phagocytés. La fragmentation typique de l'ADN est une autre caractéristique de l'apoptose. En effet, l'ADN est fragmenté entre les nucléosomes, les morceaux d'ADN générés ont donc toujours une taille multiple de 180kb. De plus, l'apoptose est un processus actif, initié par une série de signaux spécifiques et qui nécessite une dépense d'énergie (ATP) (Helewski, Kowalczyk-Ziomek et al. 2006).

1.2 Mécanisme

1.2.1 L'initiation

Le déclenchement de l'apoptose peut se faire par plusieurs voies : la cellule perçoit des dommages irréparables et active l'apoptose mais celle-ci peut aussi être déclenchée par des effecteurs du système immunitaire ou par la privation en hormones de croissance (**voir figure 2**).

1.2.1.1 Voie intrinsèque

Cette voie active l'apoptose via un stimulus interne qui peut être des dommages à l'ADN, une activation d'oncogènes, l'accumulation d'espèces réactives dérivées de l'oxygène... Ces signaux vont provoquer des réponses cellulaires différentes selon le type de cellule touché mais aussi selon la gravité des dommages qu'ils vont engendrer. Ces stimuli sont détectés par certains systèmes comme les protéines kinases ATM (Ataxia telangiectasia Mutated) ou ATR (Ataxia telangiectasia Rad3 related) dans le cas des dommages à l'ADN (voir point 1.3.2). Ces protéines kinases activent le facteur de transcription p53 qui va, dans un premier temps, engendrer une réponse destinée à réparer ces dégâts. Si les dommages sont irréversibles, p53 augmentera la transcription de gènes pro-apoptotiques, comme par exemple celui codant pour la protéine Bax. Ces protéines pro-apoptotiques vont mener à l'apoptose via une perméabilisation de la mitochondrie. Ce mécanisme est expliqué plus en détails au point 1.2.2.1.

1.2.1.2 Voie extrinsèque

Cette voie est activée par un stimulus externe, qui se lie à un récepteur de mort. Celui-ci initie une cascade de réactions qui mènera à l'apoptose. Les stimuli externes sont la plupart du temps produits par le système immunitaire qui veut éliminer une cellule infectée par un pathogène ou une cellule dangereuse pour l'organisme. Il faut noter que le système immunitaire peut aussi initier l'apoptose via le granzyme B, sécrété par les lymphocytes cytotoxiques, qui permet notamment d'activer la caspase 8.

Il existe différents récepteurs de mort (**voir figure 3**) mais tous mènent à une activation des caspases 8 et 10. Celles-ci activent une caspase effectrice (la caspase 3) qui mène à l'apoptose en clivant divers substrats (voir point 1.2.3). Par ailleurs, la caspase 8 peut cliver Bid qui va alors vers la mitochondrie et engendre une perméabilisation de la membrane mitochondriale interne (voir point 1.2.2).

- **Le récepteur de FasL :**

Le récepteur Fas est présent sous la forme d'un trimère qui change de conformation lorsque son ligand (FasL) se lie. Ce phénomène provoque la formation du complexe DISC (Death Inducing Signaling Complex) au niveau de la queue cytoplasmique. Il est composé de FADD qui se lie à Fas via son domaine de mort DD (Death Domain). Le domaine effecteur de mort DED (Death Effector Domain) de FADD permet le recrutement de la pro-caspase 8 et son activation selon le modèle de proximité : une haute concentration locale en pro-caspase 8 mène à son activation autoprotéolytique (Nagata 1994).

- **Le récepteur du TNF_ :**

Le récepteur TNF-R est associé à un domaine de mort appelé TRADD (TNF Receptor-Associated Death Domain) qui a la capacité de former deux complexes différents selon les stimulations : le complexe I et le complexe II.

Le complexe I est formé de TRAF2, cIAP1 et la kinase RIP1 qui sont recrutés par TRADD. Ce complexe permet d'activer la voie NF_Β et donc de favoriser la survie.

Le complexe II est formé de FADD recruté par TRADD. Il permet le recrutement de la pro-caspase 8 et donc le déclenchement de l'apoptose.

Le complexe I se forme dans les premières minutes et si l'activation de NF_Β est suffisante, l'inhibiteur de la procaspase 8 (FLIP) sera exprimé pour empêcher la formation du

complexe II. L'inhibiteur Flip a la même structure que la pro-caspase 8 sauf qu'il ne contient pas de domaine catalyseur. Le complexe II ne peut initier l'apoptose que lorsque l'activation de NF_Β est insuffisante (Danial and Korsmeyer 2004).

1.2.2 L'intégration

1.2.2.1 Perméabilisation de la mitochondrie

L'acteur principal de cette phase est la mitochondrie. Elle tient un rôle important dans l'apoptose car elle relâche un certain nombre de molécules essentielles à l'exécution de l'apoptose (**voir figure 2**). Ce phénomène est régulé par une famille de protéine appelée Bcl-2. Ces protéines furent identifiées suite à une translocation chromosomique. Dans ce cas, le gène Bcl-2 se retrouve alors derrière le promoteur de la chaîne lourde de l'immunoglobuline et est donc surexprimé. La fonction de ces protéines, quant à elle, fut découverte grâce aux études effectuées sur le nématode *C. elegans*. Plusieurs comparaisons avec ce modèle ont permis une meilleure compréhension de l'apoptose (**voir figure 4**). La mitochondrie ne semble pas impliquée dans l'apoptose chez les nématodes, par contre, un homologue de Apaf1 (Ced-4) active directement une caspase (Ced-3), s'il n'est pas inhibé par un homologue de Bcl-2 (Ced-9) (Olson and Kornbluth 2001).

La famille Bcl-2 contient aussi bien des protéines pro-apoptotiques (Bak, Bad, Bax, Bid...) que des protéines anti-apoptotiques (Bcl-X_L, Bcl-2, Mcl-1, Bcl-W, A1 ...) (**voir figure 5**). Selon l'équilibre entre les pro et anti-apoptotiques, la mitochondrie relâchera ou pas ses composants pro-apoptotiques. Cependant, toutes ces protéines ont certaines régions communes, appelées domaines d'homologie avec Bcl-2 (BH). Ces domaines sont constitués de segments d'hélice-_. Les protéines anti-apoptotiques contiennent les 4 domaines d'homologie identifiés tandis que les protéines pro-apoptotiques n'ont pas le domaine BH₄ (Bax, Bak et Bok) ou n'ont que le domaine BH₃ (Bid, Bad, NOXA, PUMA, Bik et Bim). Le domaine BH₄ n'est donc présent que chez les anti-apoptotiques alors que le domaine BH₃ semble indispensable pour induire l'apoptose (Adams 2003).

Les protéines BH₃-only perçoivent le signal apoptotique et le transmettent en interagissant avec les protéines anti-apoptotiques. Les domaines BH₁, BH₂ et BH₃ des protéines anti-apoptotiques se replient en un domaine globulaire qui contient une poche hydrophobique à laquelle un domaine BH₃ peut se lier. Certains membres de la sous-famille BH₃-only n'ont que certaines protéines anti-apoptotiques comme cible. Par exemple, NOXA a comme cible Mcl-1 et A1, tandis que Bad interagit uniquement avec Bcl-2, Bcl-W et Bcl-X_L. Les autres membres ont la capacité d'interagir avec toutes les protéines anti-apoptotiques. Cette interaction empêche l'action des anti-apoptotiques, ce qui permet l'activation de Bax et Bak. Par exemple, Bak ne pourra agir que si ses deux inhibiteurs, Mcl-1 et Bcl-X_L, sont tenus inactifs respectivement par NOXA et Bad (Adams and Cory 2007).

La protéine Bid, appartenant à la sous-famille BH₃-only, est clivée par la caspase 8, mais aussi par le granzyme B. Par ce clivage cytosolique, Bid devient alors t-Bid (truncated Bid) qui transloque vers la mitochondrie où il favorisera la libération du cytochrome c.

Bak et Bax semblent, point de vue de leur fonction, redondants. Il existe cependant une différence entre les deux : Bak est une protéine membranaire de la mitochondrie tandis

que Bax est une protéine cytosolique qui se déplace vers la mitochondrie en réponse à un stimulus apoptotique. C'est pour cette raison que la régulation de Bax semble plus complexe. Ces deux protéines subissent un changement conformationnel suite à un stimulus apoptotique et forment des homo-oligomères membranaires, ce qui va participer à la perméabilisation de la mitochondrie. (Cory, Huang et al. 2003)

Plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer cette perméabilisation. Le premier modèle suppose l'existence d'un canal à perméabilité transitoire (PTP) qui permettrait la libération des molécules. Il serait composé d'un canal ionique voltage dépendant (VDAC, Voltage dependent anion channel) situé dans la membrane mitochondriale externe qui se lierait à une translocase adénine nucléotide (ANT) provenant de la membrane interne. En temps normal, ces deux complexes ne sont pas en contact mais en réaction à un stimulus apoptotique, ils s'assembleraient. Ce pore permettrait de laisser passer des molécules de haut poids moléculaire, comme le cytochrome c. Un changement de potentiel a souvent été observé dans les modèles d'étude. Cette variation pourrait être la conséquence de l'ouverture du PTP. En effet, il permettrait l'entrée de solutés (Ca^{++} , K^+ , Mg^{++}) qui provoquerait un gonflement de la mitochondrie et donc la rupture de la membrane externe (Vieira, Haouzi et al. 2000).

Le second modèle suggère l'existence d'un pore formé par interaction entre des protéines de la famille Bcl-2 et la partie VDAC du PTP. Quand ce sont les protéines pro-apoptotiques qui se lient au VDAC, le pore s'ouvrirait tandis que les protéines anti-apoptotiques favoriseraient sa fermeture. Ce pore ouvert provoquerait une dépolarisation de la membrane et donc la rupture de la membrane externe suite au gonflement de la membrane interne (Olson and Kornbluth 2001).

Quoi qu'il en soit, cette perméabilisation permet la libération de molécules impliquées dans l'apoptose : le cytochrome c impliqué dans la formation de l'apoptosome (voir point 1.2.2.2), les IAP (Inhibitor of Apoptosis Protein) et les protéines telles que SMAC/DIABLO impliqués dans la régulation de l'activité des caspases (voir point 1.2.3.2). D'autres protéines relâchées ont des actions indépendantes des caspases. Par exemple, l'AIF (Apoptosis Inducing Factor) et l'endonucléase G entraîneront la condensation de la chromatine et la fragmentation de l'ADN selon un mécanisme encore inconnu, mais d'une façon indépendante des caspases. Les fragments d'ADN générés auront un haut poids moléculaire, contrairement à ceux générés de façon dépendante des caspases (van Loo, Saelens et al. 2002). Certaines protéines chaperonnes sont aussi libérées, comme Hsp 10 ou Hsp 60 (Heat shock protein). Elles faciliteraient l'activation des caspases en gardant les pro-caspases dans une conformation qui favorise le clivage protéolytique, mais aussi en aidant la formation de complexes comme l'apoptosome (Olson and Kornbluth 2001).

1.2.2.2 Formation de l'apoptosome

Une fois la mitochondrie perméabilisée, elle relâche certains composants qui vont permettre à l'apoptose de se poursuivre, comme par exemple, le cytochrome c. En temps normal, cette protéine est localisée dans l'espace intermembranaire et joue un rôle essentiel dans la chaîne respiratoire. En effet, le cytochrome c est capable de subir des oxydations/réductions, ce qui lui permet de transférer les électrons du complexe III au complexe IV.

En présence d'un stimulus apoptotique, il est donc relâché dans le cytosol où il s'associe avec Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor-1) via les domaines WD40 de celui-ci (van Loo, Saelens et al. 2002). Dans un complexe heptamérique, cette association va permettre la liaison de sept pro-caspases 9. En effet, Apaf-1 ainsi que la pro-caspase 9 contiennent un domaine CARD (caspase recruitment domain) et quand le cytochrome c se lie à Apaf-1 les domaines WD40, habituellement liés au domaine CARD, se dissocient, laissant le domaine CARD accessible. La présence d'ATP/dATP est nécessaire à la formation de cet apoptosome ; elle provoquerait un changement conformationnel de Apaf-1 (Danial and Korsmeyer 2004). Au sein de ce complexe, les caspases 9 vont être activées par promiscuité. La caspase 9 étant initiatrice, elle pourra cliver d'autres caspases effectrices comme la caspase 3.

1.2.3 L'exécution

Les caspases sont donc des acteurs essentiels de l'apoptose. D'ailleurs, certaines maladies dues à un dérèglement de l'apoptose sont en fait causées par un problème au niveau des caspases. Par exemple, la maladie de Huntington qui se caractérise par des répétitions de triplet (CAG)_n dans le gène codant pour la protéine Huntingtine provoque une activation de la caspase 8 via l'Huntingtine mutée (Danial and Korsmeyer 2004).

Les caspases (cystéinyl aspartate specific protease) clivent toujours après un résidu aspartate présent dans leurs substrats. Seulement 7 des 14 caspases connues ont un rôle dans l'apoptose (Riedl and Shi 2004). Parmi ces 7 caspases, 4 sont initiatrices (caspases 2, 8, 9, 10) et 3 sont effectrices (caspases 3, 6, 7) (**voir figure 6**). Les initiatrices ont la capacité de s'auto-cliver : par exemple, la pro-caspase 8 s'auto-clive dans le complexe Fas/FADD. Cette auto-activation se produit quand plusieurs caspases initiatrices sont proches l'une de l'autre. Elles ont aussi un pro-domaine long qui leur permet de recevoir des signaux. Ce pro-domaine est constitué de CARD (Caspase Recruitment domain) ou DED (Death Effector Domain) selon la caspase. Elles permettent d'activer les caspases effectrices en clivant après leur résidu aspartate qui se trouve entre la grande (20kDa) et la petite sous-unité (10kDa) (**voir figure 7**). Les principaux médiateurs de l'exécution de l'apoptose sont donc les caspases effectrices. Celles-ci vont alors procéder à des clivages protéolytiques qui mèneront à la fragmentation de l'ADN et à la formation de corps apoptotiques (Zimmermann, Bonzon et al. 2001). Ces derniers vont finalement être phagocytés. Les phagocytes identifient les corps apoptotiques via les phosphatidylsérines (PS) qui sont normalement dans le feuillet interne de la membrane plasmique. Quand un stimulus apoptotique survient, ces PS se délocalisent dans le feuillet externe de la membrane plasmique, ce qui les rend reconnaissables par les phagocytes.

1.2.3.1 Mécanismes d'action et substrats des caspases

Les caspases effectrices reconnaissent leurs substrats via une séquence de 4 acides-aminés et clivent après le 4^e, qui est souvent un résidu aspartate. Les substrats des caspases effectrices sont nombreux (plus de 60 protéines). La caspase 3 clive notamment ICAD, l'inhibiteur de CAD (Caspase Activated DNase), ce qui permet à cette DNase d'aller fragmenter l'ADN entre les nucléosomes. PARP (Poly ADP-Ribose Polymérase), une enzyme impliquée dans la réparation de l'ADN, est aussi une cible des caspases effectrices. En effet, PARP est clivée par la caspase 3 et donc inactivée car réparer l'ADN coûte de l'énergie et cela n'est pas nécessaire pour une cellule destinée à mourir.

Certaines protéines du cytosquelette comme l'actine sont également clivées, ceci pour permettre la formation des corps apoptotiques.

Et pour finir, les lamines, qui maintiennent l'enveloppe nucléaire, sont aussi clivées par la caspase 6, ce qui permet la vésicularisation du noyau (Chang and Yang 2000).

1.2.3.2 Régulation de l'activité des caspases

Les inhibiteurs de caspases permettent de réguler l'activité des caspases à plusieurs niveaux. Ils furent identifiés dans le génome du Baculo-virus car ils avaient la capacité d'empêcher l'apoptose dans les cellules hôtes infectées. Il faut cependant noter que ces inhibiteurs ne sont pas présents chez les nématodes.

Ces IAP (Inhibitor of Apoptosis Protein) sont présents dans le cytosol. Il en existe 8 chez les mammifères : Bruce/Apollon, ILP-2, ML-IAP, Survivin, N-IAP, c-IAP1, c-IAP2, X-IAP. Ils peuvent aussi bien inhiber une caspase effectrice qu'une caspase initiateur.

Le fonctionnement de ces IAP est basé notamment sur une dégradation protéasomale des caspases via ubiquitinylation. Ils contiennent tous un ou plusieurs domaines BIR (Baculoviral IAP Repeat), qui leur permet d'inhiber les caspases selon différents mécanismes. Par exemple, X-IAP inhibe l'activité de la caspase 9 en la séquestrant dans sa conformation monomérique. En fait, le domaine BIR3 se lie à l'endroit de reconnaissance pour la dimérisation (Riedl and Shi 2004).

Néanmoins, il existe plusieurs protéines pour contrer l'activité des IAP, et donc permettre aux caspases d'agir. Parmi celles-ci, les protéines SMAC (Second Mitochondria-derived Activator of Caspase) / DIABLO (Direct IAP Binding protein with low pI) empêchent l'action de X-IAP par une action antagoniste. SMAC/DIABLO se lie au domaine BIR3 de X-IAP, ce qui l'empêche de se lier à la caspase 9. Il est important de savoir que, pour pouvoir agir, SMAC/DIABLO doit être mature avant d'être libéré de la mitochondrie. Bien entendu, il existe d'autres protéines capables de mécanismes similaires comme HTRA2/OMI. Celles-ci se lient au domaine BIR2, ce qui empêche la liaison de X-IAP à la caspase 3. En fait, SMAC/DIABLO et HTRA2/OMI ont la capacité de se lier aussi bien au domaine BIR2 qu'au domaine BIR3 mais SMAC/DIABLO a plus d'affinité pour le domaine BIR3 tandis que HTRA2/OMI préfère le domaine BIR2 (van Loo, Saelens et al. 2002). Pour rappel, toutes ces protéines sont libérées par la mitochondrie en présence d'un stimulus pro-apoptotique. Elles vont donc lever l'inhibition des IAP sur les caspases afin de permettre leur activation.

1.3 La protéine p53

1.3.1 Introduction

Cette protéine, surnommée le « gardien du génome », est un suppresseur de tumeur. En effet, il a été montré que le gène codant pour cette protéine (TP53) est muté dans plus de 50% des cancers chez l'homme. C'est pour cette raison qu'elle est la cible de beaucoup de recherches visant à restaurer son activité dans les cancers, dans le cadre de la thérapie du cancer (Yu 2006).

Cette protéine fait partie d'une famille de protéines qui inclut p63 et p73. Cette famille a en commun le domaine de transactivation N-terminal, le domaine d'oligomérisation C-terminal et le domaine de liaison à l'ADN (**voir figure 8**). p63 et p73 ont un rôle clair dans le développement normal, par exemple p73 est important pour le développement du système

nerveux central. p53, quant à lui, semble être apparu au cours de l'évolution dans les organismes supérieurs pour empêcher le développement des tumeurs (Fridman and Lowe 2003).

En temps normal, p53 est dégradé. Cependant, il peut être stabilisé en réponse à des stress intracellulaires, comme des dommages à l'ADN causés par des irradiations UV, une hyper-prolifération ou encore l'hypoxie. Une fois stabilisée, cette protéine va pouvoir agir en tant que facteur de transcription, sous forme tétramérique, pour réguler l'expression de plus de 150 gènes.

1.3.2 Mécanisme de régulation de p53

Habituellement, le niveau de protéine p53 est contrôlé par MDM2 (Murine Double Minute 2) qui utilise plusieurs mécanismes pour empêcher la stabilisation de p53. L'effet le plus connu est l'ubiquitinylation et donc la dégradation via le protéasome de p53 médiée par MDM2 (**voir figure 9**). En effet, MDM2 est une E3 ubiquitine ligase qui, avec l'aide de la protéine p300 (E4 ubiquitine ligase), provoque l'ubiquitinylation de p53. Cette liaison entre p53 et MDM2 empêche aussi la liaison de p53 aux séquences consensus présentes dans le promoteur de ses gènes cibles. Un autre effet de MDM2 est qu'il peut induire la translocation de p53 du noyau vers le cytoplasme, l'écartant ainsi de son site d'action. Finalement, MDM2 peut recruter une histone déacétylase (HDAC1) pour déacétyler un résidu lysine, qui sera alors disponible pour l'ubiquitinylation. De plus, il faut savoir que MDM2 est un gène cible de p53. Il existe donc une boucle de régulation négative où p53 augmente l'expression de MDM2 qui dégrade p53 (Meek 2004).

L'arrêt de cette boucle de régulation se fait en réponse à un stress. Par exemple, l'hypoxie réprime l'expression de MDM2, mais le stress le plus connu reste les cassures doubles brins de l'ADN. Celles-ci initient une série de modifications post-traductionnelles qui perturbent l'interaction p53 / MDM2, comme des phosphorylations ou des acétylations. Au total, il existe 17 sites de phosphorylation ou d'acétylation sur p53 (**voir figure 10**). Il y a beaucoup de redondances parmi ces sites. Plusieurs sites différents peuvent être phosphorylés par une seule protéine kinase mais un même site peut aussi être phosphorylé par plusieurs protéines kinases différentes. L'acétylation de p53 se fait souvent sur les résidus qui sont habituellement ubiquitinylés (Bode and Dong 2004).

Les cassures doubles brins sont détectées par des protéines kinases comme ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) ou ATR (ATM and Rad-3 related). Celles-ci phosphorylent p53 sur la Sérine 15, ce qui va provoquer une série de phosphorylations comme celle de la Thréonine 18, qui engendre celles des Sérines 9 et 20. Ces modifications ont pour effet d'empêcher la liaison de MDM2 à p53 car les résidus Thr 18 et Ser 20 sont proches du site de liaison de MDM2. Cela fonctionne donc par antagonisme. ATM peut aussi phosphoryler directement MDM2 sur sa Sérine 395, ce qui bloque l'exportation nucléaire de p53. En conclusion, selon le type et le niveau de stress, les modifications post-traductionnelles sont différentes mais mènent toutes à une stabilisation et une accumulation de p53 (Meek 2004).

1.3.3 Effets de p53

Il peut y avoir deux types d'effets de p53 : les effets qui augmentent ou diminuent la transcription de gènes et ceux indépendants de la transcription.

Dans un premier temps, p53 va provoquer l'arrêt du cycle cellulaire pour donner le temps à la cellule de réparer les dégâts à l'ADN. Cela va se faire en augmentant la transcription de gènes comme CDKN1A, codant pour la protéine p21 qui arrête le cycle en phase G1/S (phase de synthèse de l'ADN). p21 est en fait une protéine inhibitrice de CDK (Cyclin Dependent Kinase) (Horn and Vousden 2007). La protéine 14.3.3_ va aussi être surexprimée et elle va bloquer le cycle en phase G2/M (phase de mitose). Ensuite, p53 va augmenter la transcription de gènes impliqués dans la réparation de l'ADN comme GADD 45.

Pour finir, si la réparation de l'ADN n'est pas possible ou si le stress est trop sévère, p53 va promouvoir l'apoptose. Il va augmenter la transcription de gènes impliqués dans la voie intrinsèque de l'apoptose, comme Bax, Noxa, PUMA ou Apaf-1 ; mais aussi des gènes impliqués dans la voie extrinsèque de l'apoptose comme Fas. De plus, la transcription des gènes codant pour les IAP va être diminuée (Meek 2004).

Enfin, il a été montré que p53 pouvait interagir directement avec certaines protéines pro ou anti-apoptotiques. Par exemple, p53 va se lier à Bcl-X_L ce qui l'empêche de séquestrer des protéines pro-apoptotiques (comme Bax ou Bak) mais il peut aussi se lier à Bak, ce qui empêche sa liaison avec Mcl-1 (anti-apoptotique) (Moll, Wolff et al. 2005). Ces différentes actions concourent toutes à initier l'apoptose de la cellule.

2. L'hypoxie

2.1 Introduction

L'oxygène est essentiel à la survie de nos cellules et donc de nos tissus. En effet, la production d'énergie via la mitochondrie nécessite la présence d'oxygène. La concentration en oxygène dans les tissus est donc étroitement régulée pour éviter un excès (hyperoxie) ou un manque (hypoxie) d'oxygène. Bien que les mécanismes mis en place pour contrer l'hypoxie ou l'hyperoxie sont différents, des points communs dans la réaction des cellules ont été observés. Par exemple, les deux conditions provoquent une production toxique de radicaux libres qui peuvent endommager l'ADN. De plus, certains gènes sont surexprimés dans les deux cas comme le gène codant pour l'hème oxygénase I ou la métallothionéine 2 (Papandreou, Powell et al. 2005).

Nos cellules ont donc développé plusieurs systèmes pour réagir et s'adapter à des conditions hypoxiques. Dans un premier temps, elles essaient de ramener à la normale la concentration en oxygène mais si le manque persiste, elles vont alors tenter de s'adapter à ces conditions pour pouvoir y survivre à long terme.

2.2 Réponses à court terme à l'hypoxie

L'hypoxie tissulaire se produit quand l'apport en oxygène ne correspond plus aux besoins du tissu. Celui-ci déclenche alors une série de mécanismes pour tenter de rétablir un bon apport en oxygène. Une des premières réactions est d'augmenter la circulation sanguine via une accélération du rythme cardiaque et de la ventilation. De plus, il y a un phénomène de vasodilatation des vaisseaux sanguins périphériques et vasoconstriction des vaisseaux sanguins pulmonaires pour projeter l'oxygène dans les régions hypoxiques (Michiels 2004). Les cellules vont réagir à l'hypoxie, notamment en hiérarchisant leur consommation

d'énergie. Elles activent la glycolyse afin de produire une quantité d'ATP suffisante au bon fonctionnement des ATPases, mais diminuent les processus de synthèses protéique et d'ADN, qui ne sont pas essentiels à la survie de la cellule à court terme. A plus long terme, elles augmentent l'expression des gènes dont les produits mènent à une adaptation à l'hypoxie. Ces processus permettent donc aux cellules de s'adapter et de survivre aux conditions d'hypoxie.

2.3 Réponses à long terme à l'hypoxie

2.3.1 Adaptation via le facteur de transcription HIF-1

Le facteur de transcription HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor-1) est stabilisé en réponse à l'hypoxie et permet une adaptation à long terme de la cellule. Il est composé de deux sous-unités HIF-1_α et HIF-1_β (aussi appelée ARNT, Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator). La protéine HIF-1_β était déjà connue pour son implication dans les phénomènes de détoxification des cellules alors que HIF-1_α est essentiellement impliqué dans la réponse à l'hypoxie. Il existe également d'autres sous-unités : HIF-2_α et HIF-3_α. HIF-2_α peut se lier à HIF-1_β mais ce complexe régule la transcription de gènes différents de ceux régulés par HIF-1. De plus, HIF-2_α semble spécifique à certains tissus, comme les cellules vasculaires endothéliales. HIF-3_α peut aussi se lier à HIF-1_β mais il ne contient pas de domaine de transactivation et ne peut donc pas interagir avec les protéines co-activatrices CBP/p300 (Bardos and Ashcroft 2005).

2.3.1.1 Structure de HIF-1

Les deux sous-unités HIF-1_α et HIF-1_β contiennent un domaine bHLH (basic Helix Loop Helix) et un domaine PAS (PER-ARNT-SIM). Le motif HLH est impliqué dans la dimérisation des protéines, alors que la région basique du domaine bHLH intervient dans la liaison de l'ADN (**voir figure 11**). Cependant, la sous-unité HIF-1_α contient d'autres domaines importants pour son activité. Le domaine ODD (Oxygen Dependent Degradation) est responsable de la dégradation de HIF-1_α en normoxie par le protéasome, tandis que les deux domaines N-TAD et C-TAD sont essentiels pour la transactivation. Le domaine C-TAD se situe en position carboxy-terminale. Ce domaine est présent dans la sous-unité HIF-1_α mais il n'est pas impliqué dans la réponse à l'hypoxie. Enfin, certaines fonctions ont été rapportées à certaines séquences. Par exemple, la séquence NLS (Nuclear Localisation Sequence) présente dans les deux sous-unités, joue un rôle dans l'importation nucléaire (Gothié and Pouyssegur 2002).

2.3.1.2 Régulation de l'activité de HIF-1

Les ARNm de HIF-1_α et HIF-1_β sont exprimés de façon constitutive dans la plupart des cellules. Par contre au niveau des protéines, il n'y a que HIF-1_α qui est présent dans le noyau car HIF-1_β est rapidement dégradé en condition de normoxie (**voir figure 12**). En effet, en présence d'oxygène, HIF-1_α est hydroxylé au niveau des résidus prolines 402 et 564 par l'HIF-prolyl hydroxylase 2 (Jaakkola, Mole et al. 2001). Ces hydroxylations permettent la liaison du facteur suppresseur de tumeur pVHL (Von Hippel Lindau protein) qui reconnaît les prolines hydroxylées dans le domaine ODD. En s'associant aux élongines C et B et à la

culline-2, un complexe fonctionnant comme une E3-ubiquitine ligase est formé qui va cibler HIF-1_α pour une dégradation protéasomale.

En condition d'hypoxie, l'HIF-prolyl hydroxylase ne peut plus hydroxyler HIF-1_α par manque de molécules d'oxygène. HIF-1_α ne sera alors plus dégradé. Une fois HIF-1_α stabilisé, il est transloqué dans le noyau où il s'associe à HIF-1_β, formant ainsi le facteur de transcription HIF-1. Celui-ci va se lier aux séquences HRE (Hypoxia Responsive Element) présentes au niveau du promoteur de ses gènes cibles pour augmenter leur transcription. Il faut noter que plusieurs co-activateurs viennent s'associer à HIF-1 pour augmenter son activité. Par exemple, les protéines CBP (CREB Binding Protein)/p300 se lient au domaine C-TAD de HIF-1_α (Gothié and Pouyssegur 2002).

2.3.1.3 Effets de HIF-1

Le facteur de transcription HIF-1 augmente l'expression de certains gènes dont les produits permettent à la cellule de survivre aux conditions d'hypoxie. Pour qu'un gène soit surexprimé via HIF-1, il doit contenir une séquence HRE dans son promoteur. Le premier gène découvert comme cible de HIF-1 est celui de l'EPO (Erythropoïétine) mais le nombre des gènes cibles connus de HIF-1 s'accroît de plus en plus et à l'heure actuelle, on pense qu'1 % du génome serait régulé par HIF-1 (Denko, Fontana et al. 2003). Il faut noter qu'en plus d'augmenter la transcription de ces gènes, l'hypoxie augmente aussi la stabilité des ARNm des gènes, comme celui du VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), de la TH (Tyrosine Hydroxylase), de GLUT-1 et pour finir de l'EPO. Leur temps de demi-vie serait de 2 à 8X plus long pour le VEGF, ou 2 à 3X plus long pour la TH. Plusieurs hypothèses ont été formulées pour expliquer ce mécanisme : pour le VEGF, il semblerait que son ARNm se lierait à certaines protéines comme la hnRNP L (Heterogeneous nucleoprotein L), ce qui le stabiliserait (Papandreou, Powell et al. 2005).

Les gènes cibles peuvent être classés en plusieurs catégories (**voir figure 13**). Tout d'abord, il y a les gènes codant pour des protéines intervenant dans le métabolisme et le transport du glucose, comme l'aldolase et l'énolase (enzymes de la glycolyse), Glut-1 (transporteur de glucose), ... Ils favorisent une production d'énergie via la glycolyse, qui n'utilise pas d'oxygène pour produire l'ATP. La glycolyse fonctionne par phosphorylation du substrat et permet de compenser la diminution de production d'ATP par la voie mitochondriale habituelle (utilisant l'oxygène). Ensuite il y a les gènes codant pour les protéines impliquées dans la survie cellulaire. Par exemple, l'IGF-2 (Insulin-like Growth Factor 2), les IGF-BP1 et 2 (IGF Binding Protein) ... qui permettent à la cellule de survivre et de continuer à proliférer dans ces conditions. La troisième catégorie regroupe les gènes impliqués dans le métabolisme du fer et l'érythropoïèse. Parmi ceux-ci, il y a bien sûr le gène de l'EPO, mais aussi le gène de la transferrine (qui est le transporteur du fer) ainsi que celui du récepteur de la transferrine. Ceux-ci vont engendrer une augmentation de la production des globules rouges et donc, provoquer une meilleure oxygénation des tissus. Finalement, certains gènes codant pour des protéines provoquant la néoangiogenèse sont surexprimés via HIF-1. La néoangiogenèse est le processus par lequel il y a formation de nouveaux vaisseaux sanguins afin de mieux irriguer les tissus. La protéine encodée par le gène du VEGF, par exemple, permet une prolifération des cellules endothéliales pour former de nouveaux capillaires. D'autres gènes, comme le gène du récepteur au VEGF, de l'endothéline-1 (stimulant la prolifération cellulaire), de la NO synthase et de l'hème

oxygénase (produisant, respectivement, le NO et CO qui induisent des modifications du flux sanguin local) participent également à ce processus (Gothié and Pouysségur 2002).

HIF-1 augmente également la transcription de MDR-1 (Multi-Drug Résistance 1) qui est une protéine de transport membranaire procurant une résistance aux médicaments en les pompant hors de la cellule (Comerford, Wallace et al. 2002).

3. L'hypoxie et l'apoptose dans le cancer

3.1 Apparition des cancers

Le cancer est une maladie caractérisée par une prolifération anarchique de cellules au sein d'un tissu sain. Dans une situation normale, une cellule qui présente une mutation dans son ADN se suicide via l'apoptose. Dans le cas d'un cancer, la cellule endommagée ne se suicide pas et continue de se diviser, ce qui engendre la formation d'une tumeur. La plupart du temps, c'est une accumulation de mutations qui initie ce processus.

3.1.1 Mutation dans les cellules tumorales

Il y a plusieurs types de mutations possibles, par exemple une mutation dans un gène suppresseur de tumeur qui engendre une perte de fonction de la protéine, ou une mutation dans un oncogène (régulateur positif de la prolifération cellulaire) qui entraîne un gain de fonction de la protéine. De façon indirecte, une mutation dans un gène de stabilité, provoquant une perte de fonction de la protéine, entraîne une augmentation du taux de mutations dans les gènes suppresseurs de tumeurs et oncogènes. Certains cancers sont également dus à une mutation héréditaire, comme quelques cas de cancers du sein. (Vogelstein and Kinzler 2004).

Les proto-oncogènes sont des gènes codant pour des protéines qui interviennent dans la prolifération cellulaire. Ces protéines peuvent être des facteurs de croissance ou leurs récepteurs, des protéines de transduction du signal ou encore des facteurs de transcription. Une mutation dans ces gènes (les transformant en oncogènes) entraîne une prolifération anarchique des cellules, qui peut mener au cancer.

Par exemple, le gène codant pour la protéine Ras est souvent muté dans les cellules tumorales. Cette protéine peut se présenter sous deux formes : Ras GDP, une protéine membranaire inactive, ou Ras GTP, active. Cette forme active favorise la transcription de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire en induisant l'activation de la voie MAPK (Mitosis Activating Protein Kinases) qui aboutit à l'activation de facteurs de transcription tels que c-myc ou c-jun. La mutation du gène codant pour Ras est une substitution d'un acide aminé. Cela provoque une augmentation de la quantité de Ras GTP par rapport à la quantité de Ras GDP, ce qui résulte en une hyper-prolifération cellulaire.

Une autre mutation possible est celle d'un gène suppresseur de tumeur, comme le gène TP53 codant pour la protéine p53, ce qui mène à une inhibition de l'apoptose. En effet, pour qu'un cancer se développe, une prolifération cellulaire dérégulée seule ne suffit pas, il faut en plus que la tumeur cancéreuse résiste à l'apoptose.

La mutation du gène TP53 concerne 50% des cancers. Dans 95% des cas, elle est située dans la région centrale de p53, ce qui correspond au domaine de liaison à l'ADN. Ce

sont souvent des mutations ponctuelles au cours desquelles il y a substitution d'un acide aminé par un autre, ce qui diffère fort des mutations des autres gènes suppresseurs de tumeur. En effet, pour ceux-ci, ce sont de grandes délétions ou des mutations avec décalage du cadre de lecture (Vousden and Lu 2002).

Quoiqu'il en soit, ces mutations aboutissent toutes à une version mutante de p53 qui se comporte comme un dominant négatif, c'est-à-dire que la présence d'une seule protéine p53 mutée dans un tétramère suffit à inhiber son activité. C'est pour ces raisons qu'un seul allèle muté suffit pour ne plus avoir de p53 fonctionnel (Bode and Dong 2004).

Une mutation des médiateurs de l'activité de p53 peut affecter les voies de signalisation permettant la stabilisation de p53 ou affecter les effecteurs de l'activité apoptotique de p53. Par exemple, il a été montré que dans les cancers du colon, une défaillance dans la voie de signalisation de MDM2, comme la perte de fonction de la protéine p14^{ARF} (inhibiteur de MDM2), engendre une dégradation permanente de p53 et donc une diminution de l'apoptose.

L'inhibition de l'apoptose n'est pas seulement due à la mutation du gène TP53. Les cellules tumorales peuvent augmenter l'expression de protéines anti-apoptotiques via, par exemple, une translocation des chromosomes 14 et 11 qui engendre une surexpression de la protéine Bcl-2 (anti-apoptotique). En effet, son gène se retrouve alors derrière le promoteur des immunoglobulines, qui est très puissant.

Les cellules tumorales peuvent également inactiver les gènes pro-apoptotiques. Dans certains types de cancer, la protéine pro-apoptotique Bax a une mutation, ce qui décale le cadre de lecture, ou dans un des domaines BH, ce qui provoque une perte de fonction de la protéine. De plus, la transcription du récepteur de FasLigand est diminuée dans certains cancers ou bien, le gène de ce récepteur est muté (Igney and Krammer 2002). Les cellules cancéreuses sont donc résistantes à l'apoptose.

3.1.2 L'hypoxie tumorale

Une tumeur solide est caractérisée par un centre hypoxique dû à la croissance rapide des cellules tumorales. Ce développement rapide provoque un mauvais apport en oxygène dû à la mauvaise diffusion de l'oxygène dans les cellules tumorales éloignées de vaisseaux sanguins. En effet, plus la tumeur grossit, plus son centre s'éloigne des vaisseaux sanguins. L'oxygène ne pouvant diffuser qu'à 0,1 mm dans les tissus, toute tumeur ayant un volume de plus de 1 mm³ contient donc des régions hypoxiques.

Cette hypoxie tumorale favorise le développement du cancer, notamment via la réponse du facteur de transcription HIF-1. Celui-ci provoque la néoangiogenèse, ce qui permet l'irrigation de la tumeur et un meilleur apport en oxygène et nutriments requis à son développement. Ce processus est donc essentiel à la survie et au développement de la tumeur. De plus, ces nouveaux capillaires sanguins permettent également la propagation des cellules tumorales via les métastases.

3.2 Stratégies de la chimiothérapie

Avant les années 50, le seul traitement efficace contre le cancer était la chirurgie mais dans les années 60, la radiothérapie fit son apparition, ce qui compléta le traitement. Malheureusement, ni la chirurgie ni la radiothérapie ne permettent d'éliminer les métastases. La chimiothérapie, quant à elle, permet d'atteindre tous les organes du corps humain ce qui

est nécessaire pour une bonne efficacité du traitement. En outre, l'approche thérapeutique a aussi évoluée. En effet, les cliniciens se basaient uniquement sur une classification histologique de la tumeur pour attribuer un traitement or, actuellement, c'est le profil moléculaire de la tumeur qui détermine le traitement à utiliser (Chabner and Roberts 2005).

La chimiothérapie et la radiothérapie ont donc été combinées afin de diminuer les phénomènes de résistance et d'augmenter l'efficacité du traitement. Plusieurs avantages ressortent de cette interaction. Par exemple, la chimiothérapie peut sensibiliser les cellules tumorales à la radiothérapie. Evidemment, la cytotoxicité de ces deux thérapies ne doit pas se chevaucher pour pouvoir utiliser les doses efficaces sans augmenter les effets secondaires sur les organes sains.

Le principe des médicaments chimiothérapeutiques est de créer des dommages à la cellule qui provoquent alors la mort de la cellule par apoptose. Il existe plusieurs sortes de médicaments, classés selon leur mode d'action.

Une première catégorie concerne les agents alkylants produisant des dommages à l'ADN, comme la cisplatine. Elle réagit avec un site nucléophile sur l'ADN ou l'ARN pour former une liaison covalente bifonctionnelle intra ou interbrins, aboutissant à l'inhibition de la réplication et de la transcription. Les dommages à l'ADN peuvent aussi être induits par des inhibiteurs de topoisomérases I ou II, comme la camptothécine ou l'étoposide. Les topoisomérases modifient la topologie de l'ADN en générant des cassures transitoires. Si elles sont inhibées, les cassures simples (topoisomérase I) ou doubles brins (topoisomérase II) sont stabilisées, ce qui provoque la mort de la cellule.

Vient ensuite la deuxième catégorie avec les antimétabolites bloquant la synthèse d'ADN. Par exemple, 5-FU (5-Fluorouracil) inhibe la synthèse d'ADN mais aussi la transcription et la synthèse de protéines. L'hydroxyurée inhibe la réparation et la synthèse de l'ADN et les gencitabines bloquent l'ADN polymérase ; ces deux agents associés à une radiothérapie permettent de fixer l'ADN endommagé suite à la radiothérapie. Cette classe comprend également les anti-folates, comme les méthotrexates, qui inhibent la synthèse d'ADN via une inhibition de la voie des folates (Chabner and Roberts 2005).

Les taxanes constituent la troisième catégorie. Ces agents interfèrent avec la polymérisation et la stabilisation des microtubules, ce qui empêche leur réorganisation nécessaire au déroulement de l'interphase et de la mitose. Au final, la cellule ne sait plus se diviser et finit par mourir.

Il existe également une classe de médicaments qui permet de ne tuer que les cellules hypoxiques, car elles sont résistantes à la radiothérapie (voir point 3.3). En les éliminant, l'efficacité du traitement en général est améliorée. La mitomycine C et les tirapazamines font partie de cette catégorie (Seiwert, Salama et al. 2007).

Plus récemment, les chercheurs se sont focalisés sur une chimiothérapie qui cible plus spécifiquement certaines protéines. Par exemple, afin de contrer l'angiogenèse, des agents anti-VEGF sont développés. Ils ont deux modes d'action possibles: le premier cible le VEGF lui-même comme le bevacizumab, tandis que le second cible le récepteur au VEGF, comme la molécule PTK787 (Donovan and Kummar 2006).

3.3 Résistance aux traitements due à l'hypoxie

Plusieurs études ont montré que l'hypoxie accélère la progression de la tumeur et des métastases. Ce mécanisme est en partie dû à une résistance des cellules hypoxiques à la radiothérapie. En effet, la présence d'oxygène permet la sensibilisation des cellules aux

rayons X car il réagit avec l'électron libre du radical créé par les rayons, ce qui permet de fixer ce radical sur l'ADN. Il faut noter qu'il existe différents degrés de résistance selon les types de rayons utilisés. Ainsi, une radiation dense, comme avec les particules α , n'est pas influencée par la présence ou l'absence d'oxygène. Par contre, n'importe quel type de cellule présente cette résistance, qu'elle soit tumorale ou pas (Brown 1999).

En ce qui concerne l'implication de l'hypoxie dans la résistance des cellules tumorales à la chimiothérapie, il a été montré, dans les tumeurs solides *in vivo*, que plusieurs facteurs associés à l'hypoxie contribuent à cette résistance. Tout d'abord, l'hypoxie augmente l'utilisation de la glycolyse pour la production d'ATP. Cela peut procurer des avantages à la tumeur car certains intermédiaires de la glycolyse sont des précurseurs d'acides aminés, ce qui favorise le développement des cellules tumorales. De plus, l'utilisation élevée de la glycolyse entraîne une acidification du milieu qui permettrait une sélection naturelle des cellules tumorales les plus résistantes.

En réponse à l'hypoxie, il y a création de nouveaux vaisseaux sanguins (néoangiogenèse) ce qui va permettre aux métastases de sortir de la tumeur et de se répandre. En outre, ces vaisseaux sanguins présentent une structure anormale, ils n'ont pas de lame basale, leur paroi est fine et ils ont beaucoup de shunts artéro-veineux. La circulation sanguine, et donc la délivrance de médicaments, est irrégulière. Ce phénomène favorise la résistance aux médicaments (Brown 1979).

L'hypoxie a comme autre effet un ralentissement ou même un arrêt du cycle cellulaire, sans doute dû aux déficiences en glucose provoquées par l'hypoxie. Ce processus participe à la résistance des cellules tumorales car les médicaments chimiothérapeutiques sont plus efficaces sur des cellules hautement prolifératives (Amellem and Pettersen 1991).

Finalement, comme expliqué au point 2.3.1.3, l'hypoxie, et plus particulièrement le facteur de transcription HIF-1, augmente l'expression de MDR-1, qui pompe les médicaments hors de la cellule.

Il existe donc différents processus par lesquels l'hypoxie procure aux tumeurs solides une résistance contre les chimiothérapies.

4. Objectifs

Les tumeurs cancéreuses sont caractérisées par un centre hypoxique qui apparaît à la suite du développement rapide des cellules tumorales. Ce centre hypoxique est responsable de l'agressivité de la tumeur, en effet, une tumeur fortement hypoxique est plus dangereuse. Cette agressivité vient du fait que le centre hypoxique provoque la résistance des cellules cancéreuses aux traitements utilisés en chimiothérapie et en radiothérapie. Le phénomène de résistance aux chimiothérapies peut également être causé par une circulation sanguine irrégulière, une diffusion difficile des médicaments, et aussi de l'oxygène, vers le centre de la tumeur... mais le phénomène étudié pendant ce mémoire est celui de la résistance à la chimiothérapie causée par l'hypoxie tumorale.

En effet, il a déjà été démontré au laboratoire que l'hypoxie protège les cellules HepG2, dérivées d'un hépatocarcinome humain, de l'apoptose induite par l'étoposide, un médicament utilisé en chimiothérapie. Celui-ci provoque des cassures doubles brins en inhibant la topoisomérase II, ce qui initie l'apoptose de la cellule. Néanmoins, le mécanisme de cette protection reste inconnu.

Le but de ce travail est, dans un premier temps, d'identifier l'implication de p53 dans l'apoptose induite par l'étoposide. Effectivement, p53 est stabilisé et activé notamment en réponse à des cassures doubles brins, c'est donc probablement via p53 que l'étoposide induit l'apoptose. Des expériences ont été menées afin de déterminer si p53 joue un rôle dans cette protection en hypoxie, l'hypothèse étant que l'hypoxie protège les cellules de l'apoptose, en diminuant le niveau de p53.

Une mise au point de l'inhibition de l'expression de p53 à l'aide de siRNA anti-p53 a tout d'abord été réalisée, pour ensuite étudier l'effet de cette extinction au niveau des ARNm des gènes cibles de p53 puis des protéines correspondantes. Cela a été effectué via des techniques telles que les microdamiers ou la PCR en temps réel pour l'expression des ARNm et le Western-Blot pour les protéines. Ensuite, l'effet de cette extinction sur l'apoptose induite par l'étoposide, en normoxie et hypoxie, fut étudié en suivant l'activité de la caspase 3 et la fragmentation de PARP.

Pour clôturer ce travail, une inhibition d'une protéine pro-apoptotique encodée par un gène cible de p53 a été réalisée afin d'en étudier l'implication de cette protéine. Tout comme pour la protéine p53, cette inhibition est réalisée à l'aide de siRNA. Elle a, bien évidemment, été mise au point avant de pouvoir observer son effet sur l'apoptose induite par l'étoposide, en normoxie et en hypoxie, comme pour l'étude de l'effet de l'extinction de p53.

L'ensemble de ces résultats nous permettra de mieux comprendre l'implication de p53 dans le mécanisme par lequel l'hypoxie protège les cellules tumorales de l'apoptose induite par la chimiothérapie. Cela aboutira peut-être à de nouvelles hypothèses quant à la résistance aux chimiothérapies, et à long terme, cela pourrait mener à augmenter l'efficacité des chimiothérapies chez les patients.

II. MATÉRIEL ET MÉTHODES	17
1. CULTURE CELLULAIRE.....	17
1.1 Matériel :	17
1.2 Méthode :	17
2. INCUBATION SOUS HYPOXIE.....	17
2.1 Matériel :	17
2.2 Méthode :	17
3. IMMUNOFLUORESCENCE	18
3.1 Principe :	18
3.2 Matériel :	18
3.3 Méthode :	18
4. EXTRACTION PROTÉIQUE TOTALE.....	19
4.1 Matériel :	19
4.2 Méthode :	19
5. DOSAGE DES PROTÉINES PAR LA MÉTHODE DE BRADFORD	19
5.1 Matériel :	19
5.2 Méthode :	19
6. WESTERN BLOT.....	20
6.1 Principe :	20
6.2 Préparation des échantillons :	20
6.3 Migration :	20
6.4 Transfert :	21
6.5 Blocking et révélation.....	21
7. DOSAGE DE L'ACTIVITÉ DE LA CASPASE 3.....	22
7.1 Principe.....	22
7.2 Matériel.....	22
7.3 Méthode.....	22
8. TRANSFECTION DE siRNA	23
8.1 Introduction	23
8.2 Matériel :	23
8.3 Méthode :	24
9. EXTRACTION D'ARN TOTAL	24
9.1 Matériel :	24
9.2 Méthode :	24
10. LA PCR EN TEMPS RÉEL	25
10.1 Principe :	25
10.2 Rétro-transcription :	25
10.3 PCR en temps réel :	26
11. MICRODAMIERS À ADN (DUALCHIP HUMAN APOPTOSIS)	26
11.1 Principe :	26
11.2 Rétro-transcription :	26
11.3 Hybridation sur les microdamiers	27

II. Matériel et Méthodes

1. Culture cellulaire

1.1 Matériel :

- Milieu de culture DMEM (1 g/l de Glucose) (Gibco, UK) contenant 10 % de sérum de veau fœtal (FBS) (Gibco, UK)
- Trypsine (0,5 g/l) – EDTA (0,2 g/l) (Gibco, UK)
- PBS (Phosphate Buffer Saline) (Whittaker, Belgique)
- Boîtes de culture de 75 cm² (T75) ou de 25 cm² (T25) ou plaques multi-puits (Costar, Corning, USA)

1.2 Méthode :

Les cellules utilisées au cours de ce travail sont des HepG2 (cellules cancéreuses humaines provenant d'un hépato-carcinome). Elles sont repiquées trois fois par semaine. Après le repiquage, elles sont incubées dans une étuve à 37°C, sous atmosphère humide comprenant 5% de CO₂, en présence de milieu DMEM avec 10% de FBS.

Le protocole pour le repiquage est le suivant :

Les cellules sont rincées avec 10 ml de PBS après avoir décanté le milieu. Elles sont ensuite incubées 4 minutes à 37°C en présence de 2ml de trypsine – EDTA afin de les détacher. Pour neutraliser l'effet de la trypsine - EDTA, 6 ml de milieu avec sérum sont ajoutés. La suspension cellulaire est transférée dans un tube de 10 ml et centrifugée 4 minutes à 1000 rpm. Le surnageant est décanté et le culot resuspendu dans 6 ml de milieu avec sérum. Après comptage dans la cellule de Neubauer, les cellules sont réparties à raison de 3.10⁶ cellules par boîte T75 ou de 10⁶ par T25.

2. Incubation sous hypoxie

2.1 Matériel :

- Milieu CO₂ - indépendant (Gibco, USA)
- L- Glutamine (36,1 mg pour 500 ml de milieu) (Sigma-Aldrich, USA)
- Etoposide (Sigma-Aldrich, USA), concentration stock de 50 mM dans du DMSO (Sigma-Aldrich, USA)

2.2 Méthode :

Le milieu est décanté et remplacé par du milieu CO₂ – indépendant (avec Glutamine) comprenant de l'étoposide si nécessaire. L'étoposide est dilué dans du milieu CO₂ – indépendant à partir de la concentration stock de 50 mM afin d'obtenir une concentration

finale de 50 μ M. Les cellules sont ensuite incubées en hypoxie (1% d'oxygène + 99% d'azote) ou normoxie à 37°C, pendant 16H.

3. Immunofluorescence

3.1 Principe :

Cette technique permet de visualiser et de localiser une protéine d'intérêt dans la cellule grâce à l'utilisation d'un set de deux anticorps. La protéine d'intérêt est mise en évidence à l'aide d'un anticorps primaire dirigé spécifiquement contre elle. Ensuite un anticorps secondaire, dirigé contre l'anticorps primaire et couplé à un fluorochrome, est ajouté. L'émission de fluorescence, due à l'excitation du fluorochrome à l'aide d'un laser, permet la détection de la protéine d'intérêt par microscopie confocale. Un marquage des noyaux par un agent intercalant de l'ADN, comme le To-Pro3, peut être réalisé afin de visualiser ceux-ci.

3.2 Matériel :

- Plaques 24 puits (Costar, Corning, USA)
- Lamelles couvre-objet de 13 mm de diamètre (Vel, Germany)
- Lames porte-objet de 2,6 x 7,6 cm (Vel, Germany)
- Solution PBS, PBS-BSA et PBS-Triton 1%, voir tableau 1
- Paraformaldéhyde 4% (PFA) (Merck, Germany)
- To-Pro3 (Molecular Probes, USA)
- Mowiol (Sigma-Aldrich, Germany-UK)
- Anticorps primaire, voir tableau 2
- Anticorps secondaire couplé à un fluorochrome, voir tableau 3
- Microscope confocal à fluorescence (Leika, Germany)

3.3 Méthode :

Repiquage de cellules :

Tout d'abord les cellules sont repiquées dans des plaques multi-puits à une densité de 25000 cellules par puits. Une lamelle couvre-objet, préalablement stérilisée à l'éthanol et séchée, est déposée au fond de chaque puits avant le repiquage.

Marquage en immunofluorescence :

L'incubation terminée, le milieu est décanté et les cellules sont fixées avec 500 μ l de PFA 4% pendant 10 minutes à RT. Après trois rinçages au PBS, les cellules sont perméabilisées avec 500 μ l de PBS-Triton 1 % pendant 5 minutes à RT. Deux rinçages sont effectués au PBS-BSA. La chambre humide est préparée en recouvrant un papier Whatman humidifié d'un parafilm. 30 μ l d'anticorps primaire dilués 100x dans du PBS-BSA sont déposés dessus et les lamelles couvre-objet sont sorties des puits puis retournées sur la goutte. Le temps d'incubation est de 2 heures à RT ou overnight à 4°C. Ensuite, les lamelles couvre-objet sont remises au fond des puits afin d'avoir les cellules en surface et trois rinçages avec 500 μ l de PBS-BSA sont effectués. Les lamelles couvre-objet sont alors déposées sur une

goutte de 30 μ l d'anticorps secondaire dilué 1000x dans du PBS-BSA, toujours en chambre humide. Le temps d'incubation est d'une heure à RT, dans l'obscurité pour préserver le fluorochrome. Une fois l'incubation terminée et les lamelles remises dans les puits, trois rincages au PBS-BSA et un au PBS sont effectués. Les lamelles sont ensuite incubées 35 minutes en chambre humide (à RT dans l'obscurité) sur une goutte de To-Pro3 dilué 80x dans une solution RNase 2mg/ml en PBS. Trois rincages au PBS sont réalisés avant de retourner les lamelles sur une goutte de Mowiol préchauffé à 56°C sur une lame porte-objet. Les lames sont conservées à 4°C avant d'être observées au microscope confocal en gardant le photomultiplicateur constant.

4. Extraction protéique totale

4.1 Matériel :

- Tampon de lyse : voir tableau 4
- Racloir de 24 mm

4.2 Méthode :

L'extraction se fait à partir de boîtes T25, sur glace. Le milieu d'incubation est transféré dans un tube 10 ml et centrifugé 5 minutes à 1500 rpm et à 4°C afin de récupérer les cellules en suspension et les corps apoptotiques. Le surnageant est décanté. Pendant la centrifugation, 200 μ l de tampon de lyse sont ajoutés à chaque T25 et les cellules sont décrochées à l'aide d'un racloir. Le lysat cellulaire est transféré sur le culot du tube de 10 ml correspondant, afin de récupérer les cellules en suspension et les corps apoptotiques. Le tout est transféré dans un eppendorf froid où les cellules sont lysées en pipetant (10x up and down). Après 5 minutes de centrifugation à 13000 rpm et à 4°C, le surnageant est aliquoté. Les aliquots sont ensuite conservés à – 80°C. Un aliquot de 10 μ l de lysat cellulaire, conservé à – 20°C, est destiné au dosage des protéines.

5. Dosage des protéines par la méthode de Bradford

5.1 Matériel :

- BSA (Bovine Serum Albumine) 2 μ g/ μ l (étalon)
- Tampon de lyse conservé de l'extraction protéique
- Colorant Bradford dilué 5x et filtré (Bio-Rad, USA)

5.2 Méthode :

Ajouter 2,5 μ l d'extrait toutes les 30 secondes à 1 ml de colorant Bradford et vortexer. Cinq minutes après l'ajout, lire la densité optique à 595 nm à l'aide d'un spectrophotomètre,

préalablement mis à zéro avec de l'eau distillée. La cuvette est rincée à l'acétone puis à l'eau entre chaque mesure.

Afin de normaliser les valeurs, plusieurs mesures sont réalisées à partir de contrôles: le blanc du test (= tampon de lyse), le blanc de l'étalon (= eau distillée) et l'étalon (= BSA).

La formule pour calculer la concentration en protéines de l'échantillon est la suivante :

$$\mu\text{g} / \mu\text{l} = \frac{(\text{Moyenne test} - \text{Moyenne blanc}) / (\text{Moyenne Etalon} - \text{Moyenne Blanc Etalon}) \times 5}{\text{Volume des échantillons}}$$

6. Western Blot

6.1 Principe :

Cette technique permet de séparer des protéines selon leur poids moléculaire et de les détecter ensuite de façon semi-quantitative. La première étape consiste à séparer les protéines sur un gel de polyacrylamide en présence de SDS (Sodium Dodécyl Sulfate) qui dénature les protéines en les chargeant négativement. L'application d'un courant électrique permet la migration des protéines dans le gel et leur séparation en fonction de leur poids moléculaire. La deuxième étape est le transfert des protéines sur une membrane. Celle-ci sera incubée en présence d'un anticorps spécifique à la protéine d'intérêt. Ce dernier sera reconnu par un anticorps secondaire couplé à une peroxydase qui permettra la révélation sur des films photographiques.

6.2 Préparation des échantillons :

Un volume bien précis de chaque extrait est prélevé de façon à avoir la même quantité de protéines dans chaque puits. Du bleu de charge (voir tableau 6) est ajouté à chaque condition (1/5 du volume final) et le tout est mis à volume avec de l'eau distillée afin de charger 20 μ l par puits. Les échantillons sont chauffés 5 minutes à 100°C et brièvement centrifugés.

En vue d'une séparation des protéines à l'aide de gels pré-coulés Nu-PAGE, le bleu de charge utilisé est le « Nu-PAGE LDS Sample Buffer (4x) » et les protéines sont dénaturées 10 minutes à 70 °C.

6.3 Migration :

6.3.1 Tris-Glycine :

Matériel :

- Gel séparateur, voir tableau 6
- Gel concentrateur, voir tableau 6
- Tampon d'électrophorèse, voir tableau 6
- Cuve d'électrophorèse (Life technologies Model V15.17, Invitrogen, USA)
- Générateur (Pharmacia BioTech Electrophoresis Power Supply EPS 3500)
- Etalon de poids moléculaire See Blue plus 2 (Invitrogen, USA)

Méthode :

Une fois le montage des plaques fini, le gel séparateur est coulé jusqu'à un centimètre en dessous du peigne. De l'isobutanol est déposé à la surface du gel pour éviter que l'oxygène interfère avec la polymérisation du gel. Une fois le gel séparateur polymérisé, l'isobutanol est retiré et la surface du gel est rincée à l'eau distillée. Le gel concentrateur est ensuite coulé jusqu'au dessus des plaques et le peigne est placé pour former les puits. Une fois le gel polymérisé, le peigne est retiré et les gels sont placés dans la cuve. Après l'ajout du tampon de migration, les échantillons sont chargés de façon asymétrique dans les puits, avec un étalon de poids moléculaire. La migration se fait à voltage constant (200V), pendant 1 heure.

6.3.2 Nu-PAGE

Matériel :

- Gels 4% _ 12% (Invitrogen, USA)
- Tampon de migration MOPS ou MESS (Invitrogen, USA)
- Nu-PAGE Anti-oxydants (Invitrogen, USA)
- Etalon de poids moléculaire See blue plus 2 (Invitrogen, USA)
- Cuve d'électrophorèse (Invitrogen, USA)
- Générateur (Bio-Rad Power PAC 300)

Méthode :

Le gel étant pré-coulé, il faut simplement placer les gels dans la cuve (vers l'intérieur) et remplir cette cuve de tampon de migration comprenant les anti-oxydants dans le compartiment central et de tampon de migration dans le compartiment extérieur. Les échantillons sont ensuite chargés dans les puits. La migration se fait à ampérage constant (400mA), pendant une heure.

6.4 Transfert :

Matériel :

- Appareil de transfert : Hoeffer Semiphor (Amersham, USA)
- Papier Whatman (Merck, Germany)
- Membrane PVDF (Amersham, USA)
- Tampon de transfert, voir tableau 6

Méthode :

La membrane est tout d'abord réhydratée dans du méthanol 100% pendant 1 minute puis équilibrée dans du tampon de transfert pendant 5 minutes. Les papiers Whatman ainsi que les éponges qui serviront pour faire le sandwich sont humidifiés avec du tampon de transfert. Le gel est démoulé et le sandwich est réalisé. Entre chaque couche du sandwich, les bulles d'air sont éliminées pour ne pas perturber le passage du courant. Le transfert se fait overnight à 30mA ou pendant 2 heures à 150 mA.

6.5 Blocking et révélation

Matériel :

- Tampon de rinçage : TBS (Tris-Buffer-Saline)-Tween 0,1%, pH7,6, voir tableau 6

- Anticorps primaires et secondaires, voir tableaux 7 et 8
- Agent bloquant (Amersham, USA)
- Substrat de révélation : ECL Advance Western Blotting Detection Kit (Amersham, USA)
- Film photographique (Amersham, USA)
- Solutions de révélation et de fixation (Ilford 2000RT Imaging, USA)

Méthode :

Une fois le transfert terminé, le sandwich est démoulé et la membrane est bloquée dans du TBS-Tween 0,1% contenant 2% d'agent bloquant pendant 2 heures à RT. Ensuite, elle est incubée 2 heures à RT ou « overnight » à 4°C dans un biberon contenant l'anticorps primaire dans 15 ml de TBS-Tween + 2% d'agent bloquant. Après trois lavages de 15 minutes dans du TBS-Tween 0,1%, elle est incubée 45 minutes à RT avec l'anticorps secondaire dilué dans du TBS-Tween 0,1% + 2% d'agent bloquant. Pour finir, elle est lavée trois fois pendant 20 minutes dans du TBS-Tween 0,1%.

La révélation se fait en chambre noire en exposant un film photographique pendant un certain temps sur la membrane. Ensuite, le film est plongé dans une solution révélatrice, puis rincé dans de l'eau, fixé 4 minutes dans la solution fixatrice et enfin rincé abondamment à l'eau.

7. Dosage de l'activité de la caspase 3

7.1 Principe

La caspase 3 est une caspase effectrice qui est clivée par une caspase initiateur lorsque l'apoptose est déclenchée. Elle va cliver certains substrats après un résidu aspartate, ce qui correspond à la phase d'exécution de l'apoptose. Un dosage de l'activité de la caspase 3 permet donc d'estimer le pourcentage de cellules en phase d'exécution de l'apoptose. L'activité de la caspase 3 est mise en évidence à l'aide d'un substrat fluorogénique Ac-DEVD-AFC. Ce substrat est composé de la séquence d'acides aminés en amont du site de clivage de PARP (DEVD) et d'un fluorochrome (7-amino-4-fluorométhylcoumarine). La caspase 3 clive le substrat entre D et AFC, libérant ainsi AFC qui peut être quantifié en fluorescence.

7.2 Matériel

- Plaques 6 puits (Costar, Corning, USA)
- PBS
- Tampon de lyse, voir tableau 9
- Tampon de réaction, voir tableau 9
- Substrat artificiel Ac-DEVD-AFC (BD Pharmingen) dilué dans du DMSO (1 mg/ml)
- DMSO (Diméthyl Sulfoxyde) (Sigma-Aldrich, USA)
- Lecteur de fluorescence

7.3 Méthode

Les cellules ont été préalablement repiquées dans des plaques 6 puits à raison de 250000 cellules par puits. 24H après ce repiquage, elles sont transfectées avec des siRNA, puis incubées en hypoxie 16H à 37°C.

Le milieu est ensuite décanté et récupéré dans un tube 10 ml qui est centrifugé à 1000 rpm, 4°C pendant 5 minutes de façon à récupérer les cellules en suspension et les corps apoptotiques. Pendant ce temps, les puits sont raclés dans 200 μ l de PBS froid et la suspension cellulaire est transvasée dans un eppendorf froid. Les puits sont rincés avec 200 μ l de PBS froid qui sont ensuite ajoutés à l'eppendorf. Le culot des tubes 10 ml est resuspendu dans 100 μ l de PBS froid, qui sont transvasés dans l'eppendorf par après. Celui-ci est centrifugé à 1000 rpm, 4°C pendant 5 minutes. Le culot comprenant les cellules est resuspendu dans 50 μ l de tampon de lyse puis l'eppendorf est mis sur roue pendant 30 minutes, à 4°C. Il est ensuite centrifugé à 13000 rpm, 4°C pendant 5 minutes. Le surnageant est aliquoté et conservé à – 80°C ou -20°C pour l'aliquot destiné au dosage des protéines.

Afin de doser l'activité de la caspase 3, 5 à 10 μ g de protéines sont requis. Le volume de lysat cellulaire correspondant à cette quantité de protéines est porté à un volume de 50 μ l avec du tampon de lyse et 50 μ l de tampon de réaction sont aussi ajoutés. De minute en minute, 1 μ l de substrat est ajouté dans chaque eppendorf. Après une heure d'incubation à 37 °C dans l'obscurité, la fluorescence (longueur d'onde d'excitation : 400 nm, longueur d'onde d'émission : 505 nm) est mesurée de minute en minute. Un blanc est réalisé afin de normaliser les résultats, via la formule suivante : **Test – BE**

Le blanc enzyme (BE) est composé de 50 μ l de tampon de lyse, 50 μ l de tampon de réaction et d'1 μ l de substrat Ac-DEVD-AFC

8. Transfection de siRNA

8.1 Introduction

Les siRNA (Small interfering RNA) sont des petits ARN doubles brins utilisés pour inhiber l'expression d'une protéine. Une fois transfecté dans la cellule à l'aide d'un agent transfectant efficace, le siRNA est reconnu par le complexe RISC (RNA Induced Silencing Complex) qui désapparie les deux brins. Selon l'extrémité par laquelle le désappariement a eu lieu, RISC va s'associer à un des deux brins. Le complexe RISC reconnaît alors l'ARNm correspondant à la séquence du siRNA. Si l'appariement est parfait, RISC clive le messenger ce qui provoque sa dégradation. Si il y a quelques « mismatch », il bloque la traduction du messenger. Dans les deux cas, l'abondance de la protéine correspondante est fortement diminuée.

8.2 Matériel :

- Si GENOME SMART pool TP53 (M-003329-01, Dharmacon, USA)
- Si GENOME SMART pool BAK1 (M-003305-01, Dharmacon, USA)
- Si CONTROL non-targeting siRNA #1 (D-001210-01, Dharmacon, USA)
- Si CONTROL RISC-Free siRNA (D-001220-01, Dharmacon, USA)
- DharmaFECT N°1 siRNA transfection reagent (T-2001, Dharmacon, USA)
- Milieu Opti-MEM (Gibco, UK)

8.3 Méthode :

Les cellules sont repiquées 24H avant la transfection. Le milieu est décanté et remplacé par le milieu de transfection pendant 24H (voir tableau 10). Une fois cette incubation terminée, le milieu de transfection est remplacé par du milieu complet.

Milieu de transfection :

1. Préparer les tubes 1 et 2 puis attendre 5 minutes à RT
 - Tube 1 (siRNA + milieu Opti-MEM) : siRNA de concentration stock 20 μ M dilué dans 1/10 du volume final de transfection, de façon à avoir la concentration finale souhaitée.
 - Tube 2 (Agent transfectant + milieu Opti-MEM) : DharmaFECT dilué 500x par rapport au volume final de transfection
2. Ajouter le contenu du tube 1 dans le tube 2 et attendre 20 minutes que les complexes se forment.
3. Mettre à volume avec du milieu complet (DMEM + sérum).

9. Extraction d'ARN total

9.1 Matériel :

- Kit d'isolation d'ARN total RNeasy (Qiagen, USA)
- Ethanol (Merck, Germany)
- H₂O-DEPC (Diéthyl Pyrocarbonate) (Acros Organics, USA)

9.2 Méthode :

Pour éviter la dégradation de l'ARN, toutes les étapes se font en condition RNase free (c'est-à-dire que tout doit être lavé au SDS 1% : la paillasse, les micropipettes, les boîtes de tips... et il faut porter des gants).

Les boîtes T75 sont posées sur glace une fois l'incubation terminée et le milieu est décanté. Elles sont ensuite racless dans 600 μ l de tampon de dénaturation et le lysat est transféré dans un eppendorf froid. 60 μ l de d'acétate de sodium 2M sont additionnés et après avoir homogénéisé la solution, 600 μ l de Phénol : Chlorophorm : Isoamyl Alcohol sont ajoutés. Le tout est vortexé jusqu'à homogénéisation puis incubé 15 minutes sur glace. Après une centrifugation de 20 minutes à 10000g à 4°C, la phase aqueuse contenant l'ARN (phase supérieure) est récupérée et transférée dans un nouvel eppendorf. 600 μ l d'isopropanol sont ajoutés à RT puis l'eppendorf est incubé 45 minutes à -20°C afin de précipiter l'ARN. Ensuite, il est centrifugé à 13000g pendant 10 minutes à 4°C et le surnageant est décanté. Le culot est rincé avec 1 ml d'éthanol 75% à 4°C puis centrifugé à 13000g à 4°C pendant 10 minutes. Le culot est séché à l'air, ou à l'aide du speedvac, puis resuspendu dans 25 μ l d'eau RNase free.

2 μ l d'extraits sont prélevés et dilués dans 98 μ l d'eau RNase free pour le dosage de la quantité d'ARN récupéré. L'absorbance est lue à 230, 260 et 280 nm dans une cuve en quartz au spectrophotomètre. Une unité d'absorbance à 260 nm correspond à 40 μ g/ml. Les ratios 260/230 et 260/280 permettent d'estimer respectivement la concentration en sels et la contamination de l'ARN par des protéines. Le ratio 260/230 doit être supérieur à 1,7, tandis

que le ratio 260/280 doit être supérieur à 1,5. L'intégrité de l'ARN peut être déterminé à l'aide d'un bioanalyser (Agilent). Le ratio d'ARN 28s/18s d'un ARN intègre est proche de 2.

10. La PCR en temps réel

10.1 Principe :

Cette technique permet de quantifier l'abondance de transcrits d'un gène d'intérêt en suivant l'incorporation d'une sonde fluorescente dans les amplicons générés au cours de la réaction de PCR (Polymerase Chain Reaction). L'ARNm doit d'abord être rétro-transcrit par une transcriptase inverse afin d'obtenir de l'ADN complémentaire (ADNc). Ce dernier va être amplifié par PCR à l'aide d'une polymérase thermostable et à la fin de chaque cycle, la quantité d'amplicons va être mesurée grâce à la sonde SYBR Green qui émet de la fluorescence quand elle est intégrée à de l'ADN double brin. La quantité d'ADNc présent au départ est inversement proportionnelle au cycle seuil (Ct, Cycle Threshold). Ce dernier correspond au cycle où le signal de fluorescence est significativement et statistiquement plus élevé que le bruit de fond. Le Ct servira, après normalisation, à comparer l'abondance de l'ARNm d'un gène d'intérêt dans les différentes conditions étudiées. La normalisation est effectuée en utilisant les valeurs de Ct d'un gène de référence (HouseKeeping Gene, HKG) dont l'expression n'est pas influencée par les conditions étudiées. Par exemple, les gènes de l'α-tubuline, TBP ou RPL13A peuvent être utilisés.

10.2 Rétro-transcription :

Matériel :

- Oligo(dT) (Invitrogen, USA)
- Superscript II (Invitrogen, USA)
- ARN total
- Reaction mix, voir tableau 11
- RNase H (2U/μl) (Invitrogen, USA)
- Eau RNase free

Méthode :

2 μg d'ARN total sont dilués dans de l'eau RNase-free dans un eppendorf pour atteindre un volume final de 7,5 μl auquel sont ajoutés 2 μl d'oligo(dT) (500ng/μl). Après une incubation de 10 minutes à 70°C afin d'éliminer les hairpins, l'eppendorf est placé sur glace pendant 5 minutes puis centrifugé brièvement. 9μl de mix de réaction sont ajoutés puis le tout est incubé 5 minutes à RT. 1,5 μl de Superscript II sont ajoutés et, après une brève centrifugation, l'eppendorf est incubé 1h30 à 42°C pour permettre la rétro-transcription de l'ARNm. De nouveau, l'échantillon est brièvement centrifugé puis incubé 15 minutes à 70°C afin de dénaturer la superscript. Après une brève centrifugation, 1 μl de Rnase H est additionné afin de dégrader l'ARNm restant. Pour finir, l'échantillon est centrifugé brièvement, incubé 20 minutes à 37°C, centrifugé brièvement et immédiatement congelé à -20°C.

10.3 PCR en temps réel :

Matériel :

- Master mix SYBR Green PCR (Applied Biosystem, Holland)
- Amorces sens et anti-sens (Applied Biosystem, Holland), voir tableau 12
- Plaques 96 puits (96 well optical reaction plates, Applied Biosystem, Holland)
- Film plastique auto-collant (Optical adhesive covers, Applied Biosystems, Holland)
- 7000 sequence detection system (Applied Biosystem, Holland)

Méthode:

20 μ l du mix préparé pour chaque gène (voir tableau 13) sont déposés dans les puits concernés. 5 μ l d'ADNc dilué 100x sont ajoutés dans les puits ensuite la plaque est recouverte d'un film plastique et centrifugée à 600 rpm pendant 5 minutes. La plaque est alors prête à être analysée par l'appareil.

La PCR commence par une étape de dénaturation à 95°C pendant 10 minutes. Ensuite, 40 cycles (15 secondes de dénaturation à 95°C, 1 minute d'hybridation et d'élongation des amorces à 60°C) sont réalisés. Au cours de ces cycles, la fluorescence est mesurée en permanence.

Il faut ensuite calculer le fold d'induction par rapport à une condition contrôle :

- 1) La valeur Ct d'un gène d'intérêt est normalisée par rapport à la valeur Ct d'un house-keeping gene :

$$\Delta Ct = Ct \text{ gène d'intérêt} - Ct \text{ HKG}$$

- 2) Cette valeur est normalisée par rapport à la condition contrôle:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ gène d'intérêt dans la condition test} - \Delta Ct \text{ gène d'intérêt dans la condition contrôle}$$

- 3) Le niveau d'induction du gène par rapport à la condition de référence (fold d'induction) est ensuite calculé à partir de ces données :

$$\text{Fold d'induction} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

11. Microdamiers à ADN (DualChip Human Apoptosis)

11.1 Principe :

Le microdamier utilisé contient des sondes de détection pour 123 gènes impliqués principalement dans la régulation de l'apoptose. Il permet d'évaluer les variations d'abondance de l'ARNm de ces gènes selon les différentes conditions. Après isolation de l'ARN, l'ARNm est rétro-transcrit en ADNc à l'aide d'amorces poly-T et en incorporant des dCTP biotinylés. L'ADNc obtenu est ensuite mis en présence du microdamier pendant 16 heures de façon à permettre son hybridation sur les différentes sondes. L'ADNc hybridé est alors détecté à l'aide d'un anticorps anti-biotine couplé à la cyanine 3. Les lames sont ensuite analysées à l'aide d'un scanner laser confocal. La liste des gènes détectés pour la DualChip Human Apoptosis est présentée dans l'annexe 1.

11.2 Rétro-transcription :

Matériel :

- Mix dNTP 10x, voir tableau 14

- Mix contenant l'ARNm, voir tableau 14
- Reaction mix, voir tableau 14
- Superscript II (200U/μl) (Invitrogen, USA)
- Solution RNase H (2U/μl) (Invitrogen, USA)

Méthode :

2 μl de Standard interne et 2 μl d'oligo dT sont ajoutés à 20 μg d'ARN. Après avoir été porté à un volume de 9,5 μl avec de l'eau RNase-free et brièvement centrifugé, le mix contenant l'ARNm est incubé 10 minutes à 70°C puis de nouveau centrifugé brièvement. Tout de suite après, le mix est incubé sur glace 5 minutes et centrifugé brièvement. Ensuite, le reaction mix est ajouté et le tout est brièvement centrifugé. Après 5 minutes d'incubation à RT et une brève centrifugation, 1,5 μl de Superscript II est additionné puis l'eppendorf est brièvement centrifugé et incubé 1h30 à 42°C. Après une seconde incubation de 90 minutes en présence de la superscript et une brève centrifugation, l'ADNc obtenu est incubé 15 minutes à 70°C puis brièvement centrifugé. Après l'ajout de 1 μl de RNase H, l'eppendorf est brièvement centrifugé et incubé 20 minutes à 37°C. L'ADNc est ensuite dénaturé pendant 3 minutes à 95°C (après avoir été brièvement centrifugé). Pour finir, l'ADNc est conservé à -20°C.

11.3 Hybridation sur les microdamiers

Matériel :

- Kit DualChip Human Apoptosis, voir tableau 15
- Blocking buffer, voir tableau 15
- Washing buffer, voir tableau 15
- Solution d'anticorps anti-biotine Cy 3 dilué 1000x dans du blocking buffer
- Scanner

Méthode :

Une fois le mélange d'hybridization contenant l'ADNc biotinylé préparé (voir tableau 15), il est injecté dans les chambres d'hybridation du microdamier. L'hybridation se poursuit pendant une nuit dans un ThermoBlock à 60°C et sous agitation.

Après l'hybridation, les chambres d'hybridation sont retirées et les lames subissent une série de lavages au washing buffer selon le protocole fourni par Eppendorf. Elles sont ensuite incubées 45 minutes à RT en présence de l'anticorps anti-biotine couplé à la cyanine 3. Après cette incubation, les lames sont de nouveau lavées avec le washing buffer puis à l'eau. Après 5 minutes de centrifugation à 600 rpm afin de sécher les microdamiers, ils sont scannés à 543 nm avec un scanner laser confocal. Les images obtenues sont ensuite traitées avec le programme « Silverquant Analysis » qui permet de quantifier l'intensité de fluorescence associée à chaque spot. L'analyse est réalisée sur base de ces valeurs.

Les valeurs obtenues sont corrigées en tenant compte du bruit de fond local et du contrôle négatif d'hybridation. Les spots sont considérés comme détectés si leur intensité est supérieure à deux fois celle du bruit de fond local. Les spots dont l'intensité est supérieure à 100000 sont considérés comme saturés. Afin d'avoir un maximum de données exploitables, les damiers sont scannés à trois gains différents (100, 70 et 50). Les valeurs sont ensuite normalisées via les standards internes ajoutés à l'ARNm avant la rétro-transcription, ce qui permet de normaliser les efficacités de la rétro-transcription. Ensuite, une seconde normalisation est effectuée sur base des HouseKeeping Genes afin d'éliminer le biais dû à la quantité d'ARN de départ.

III. RÉSULTATS ET DISCUSSION28

1. Etude de l'effet de l'inhibition de l'expression de p53 sur l'apoptose induite par l'étoposide en hypoxie et en normoxie	28
1.1 Mise au point de l'inhibition de l'expression de p53	28
1.1.1 Introduction	28
1.1.2 Evaluation de l'inhibition de l'expression de p53 par marquage en immunofluorescence	29
1.1.3 Evaluation de l'extinction de p53 par Western-Blot	30
1.1.4 Evaluation de l'extinction de l'ARNm de p53 par PCR en temps réel et microdamiers « Human apoptosis »	30
1.1.5 Conclusion	31
1.2 Effet de l'extinction de p53 sur l'expression de ses effecteurs	32
1.2.1 Introduction	32
1.2.2 Effet de l'extinction de p53 sur l'expression de ses gènes cibles	32
1.2.2.1 Evaluation par microdamiers « Human Apoptosis »	32
1.2.2.2 Evaluation par PCR en temps réel	33
1.2.3 Effet de l'extinction de p53 sur l'expression des protéines encodées par ses gènes cibles	34
1.3 Etude de l'effet de l'extinction de p53 sur l'apoptose induite par l'étoposide, en normoxie et en hypoxie	35
1.3.1 Introduction	35
1.3.2 Evaluation de l'abondance de p53	36
1.3.3 Evaluation par un dosage de l'activité de la caspase 3	36
1.3.4 Evaluation du clivage de la protéine PARP par Western-Blot	37
1.3.5 Conclusion	38
2. Etude de l'effet de l'inhibition de la protéine pro-apoptotique Bak sur l'apoptose induite par l'étoposide	38
2.1 Introduction	38
2.2 Mise au point de l'inhibition de l'expression de Bak	39
2.2.1 Evaluation par Western-Blot	39
2.2.2 Evaluation par PCR en temps réel	40
2.3 Effet de l'extinction de Bak sur l'apoptose induite par l'étoposide, en normoxie et en hypoxie	40
2.3.1 Evaluation par dosage de l'activité de la caspase 3	40
2.3.2 Evaluation par Western-Blot	41
2.4 Conclusion	42

III. Résultats et Discussion

Ce travail se divise en deux parties. Dans un premier temps, l'effet de l'inhibition de l'expression de p53 sur l'apoptose induite par l'étoposide en hypoxie et en normoxie est étudié. Pour cela, nous avons d'abord mis au point l'inhibition de l'expression de la protéine p53 à l'aide de siRNA anti-p53. Ensuite, l'effet de cette inhibition sur les effecteurs du facteur de transcription p53 a été observé au niveau des ARNm et des protéines. Pour terminer cette première partie, l'effet de l'inhibition de l'expression de p53 sur l'apoptose induite par l'étoposide, en hypoxie et en normoxie, a été étudié. Le but de ces expériences est de tester l'hypothèse selon laquelle l'hypoxie protège les cellules HepG2 de l'apoptose induite par l'étoposide notamment en diminuant l'abondance du facteur de transcription p53. Cela permettrait de mieux comprendre le mécanisme par lequel l'hypoxie protège les cellules HepG2 de l'apoptose.

La deuxième partie consiste à étudier l'effet de l'inhibition de l'expression d'un gène cible de p53 codant pour une protéine pro-apoptotique, sur l'apoptose induite par l'étoposide. Le but étant, dans ce cas, de vérifier si une diminution des effecteurs de p53 peut engendrer une protection similaire à celle observée en hypoxie ou en présence du siRNA anti-p53. Inhiber l'expression d'une protéine pro-apoptotique encodée par un gène cible de p53 est donc la meilleure façon de visualiser cet effet.

Pour rappel, l'étoposide est un agent fréquemment utilisé en chimiothérapie. Il est administré par voie orale ou intraveineuse lors des chimiothérapies servant à traiter de multiples cancers, comme par exemple, le cancer du poumon, des testicules ou certaines leucémies. Sa structure chimique est représentée à la **figure 1**. Cet agent inhibe la topoisomérase II, ce qui provoque l'apparition de cassures doubles brins dans l'ADN. Si celles-ci ne sont pas réparées, elles engendrent l'apoptose de la cellule en activant la protéine p53.

1. Etude de l'effet de l'inhibition de l'expression de p53 sur l'apoptose induite par l'étoposide en hypoxie et en normoxie

1.1 Mise au point de l'inhibition de l'expression de p53

1.1.1 Introduction

L'expression de la protéine p53 est inhibée en utilisant des siRNA dirigés contre son ARNm. Les siRNA utilisés dans ce cas-ci sont un « Smart-pool », ce qui correspond à un mélange de quatre siRNA différents, tous dirigés contre l'ARNm de p53. L'avantage est que chacun de ces quatre siRNA est dirigé contre une partie différente du messenger de p53, ce qui donne un effet combiné de chacun et donc une très bonne efficacité. De plus, la concentration de chaque siRNA est plus faible, ce qui réduit fortement leur toxicité. Ces siRNA sont transfectés à l'intérieur de la cellule grâce à l'agent DharmaFECT 1, qui est un agent lipofectant de faible toxicité. Il permet la transfection efficace de petites séquences d'ARN double brin.

Les paramètres à ajuster pour obtenir une extinction optimale sont le délai post-transfection et la concentration en siRNA utilisée. Il faut noter que les cellules sont mises en présence du mix de transfection (agent transfectant et siRNA) pendant 24H. Suite à cela, un délai de 24H ou de 48H est respecté avant d'évaluer l'effet du siRNA sur l'expression de la protéine. Ces délais ont pu être réalisés grâce à la faible toxicité de l'agent transfectant, qui permet la réalisation de longues transfusions. Les concentrations en siRNA testées furent 10 nM, 20 nM et 50 nM. Les différents contrôles réalisés sont les suivants : le premier est un contrôle qui ne contient ni l'agent transfectant, ni de siRNA. Le deuxième permet de vérifier que l'agent transfectant en lui-même ne provoque pas une réaction de la cellule. Il est composé de l'agent transfectant mais pas de siRNA. Le dernier contrôle contient un siRNA Non-Targeting (NT), qui remplace le siRNA contre p53. Ce siRNA NT, utilisé à une concentration de 50 nM, ne cible aucun ARNm humain et ne doit normalement pas avoir d'effets sur les cellules. Il est utilisé comme contrôle négatif.

1.1.2 Evaluation de l'inhibition de l'expression de p53 par marquage en immunofluorescence

But et description de l'expérience

Le but de cette expérience est d'étudier l'efficacité de transfection et de visualiser l'extinction de la protéine p53 suivant les différents paramètres testés (concentration en siRNA et délai post-transfection). Cette efficacité est évaluée par marquage en immunofluorescence, technique semi-quantitative qui permet de visualiser l'abondance de la protéine ainsi que la localisation de celle-ci dans la cellule.

Les cellules sont d'abord repiquées en plaques 24 puits (à raison de 25000 cellules par puits). Deux plaques sont préparées : une pour être observée 24H après la transfection et l'autre 48H après la transfection. La transfection est réalisée avec les différentes concentrations de siRNA et les différents contrôles décrits au point 1.1.1. Le milieu de transfection est remplacé après 24H par du milieu complet. La première plaque est analysée 24H après ce changement de milieu, tandis que la deuxième est laissée au repos pendant 24H supplémentaires dans le milieu complet. Au cours du marquage en immunofluorescence, les noyaux sont marqués au ToPro 3 tandis qu'un anticorps primaire reconnaît la protéine p53. L'anticorps secondaire couplé à l'Alexa 488 permet sa détection.

Analyse des résultats

Les résultats obtenus sont présentés à la **figure 2**. Après un délai post-transfection de 24H, on observe une extinction importante de p53 en général, en comparaison à la quantité de p53 dans le contrôle. Avec une concentration de 10 nM, l'extinction de p53 est un peu moins efficace qu'avec les autres concentrations, bien qu'elle reste assez importante. La condition avec le siRNA NT n'induit pas de diminution de l'abondance de la protéine par rapport au contrôle. De même, la quantité de p53 dans les cellules en présence de l'agent transfectant seul reste élevée. Cela nous permet de dire que l'extinction de la protéine est bien due au siRNA anti-p53 et pas due à un effet traumatisant de la transfection.

Après un délai de 48H, la quantité de protéine p53 correspond à celle observée après un délai de 24H, pour les mêmes conditions. En effet, que ce soit le contrôle avec le siRNA NT ou avec l'agent transfectant seul, p53 est présent dans les mêmes quantités que pour le

contrôle non transfectée. Les différentes concentrations en siRNA engendrent une forte extinction de la protéine dans la majorité des cellules.

En conclusion, cette expérience nous permet de montrer que l'extinction de p53 est bien due au siRNA et que la transfection est efficace. Les différences observées entre les différents paramètres ne sont pas assez significatives que pour choisir une concentration et un délai, à ce stade-ci.

1.1.3 Evaluation de l'extinction de p53 par Western-Blot

But et description de l'expérience

Le but de cette expérience est de choisir la concentration et le délai post-transfection nécessaires pour obtenir une extinction optimale de p53, la première technique d'évaluation de l'efficacité de la transfection par marquage en immunofluorescence ne nous l'ayant pas permis. La quantité de p53 sera donc évaluée par Western-Blot en fonction des différentes concentrations, ceci après les deux délais post-transfection. La technique du Western-Blot a été choisie car elle permet une meilleure évaluation de la quantité de protéines présente.

Les cellules sont tout d'abord repiquées dans des boîtes T25 (un million de cellules par boîte), une pour chaque condition sachant que chaque condition est réalisée en double pour pouvoir évaluer l'efficacité de transfection après 24H et 48H. Après une transfection de 24 H, elles sont mises au repos pendant 24H et 48H. S'ensuivent une extraction protéique totale et un Western-Blot. Un contrôle de charge (α -Tubuline) est réalisé afin de permettre de comparer la quantité de protéines chargées pour les différentes conditions.

Analyse des résultats

Les résultats du Western-Blot sont présentés à la **figure 3**. Pour le délai de 24H, le contrôle de charge montre bien que la quantité de protéines chargée dans chaque puits est la même. En ce qui concerne les concentrations en siRNA, l'extinction de la protéine est plus marquée pour 50 nM que pour 10 ou 20 nM. Avec un délai de 48H, l'effet est le même, bien que le contrôle de charge ne soit pas identique pour toutes les concentrations. La concentration de 50 nM permet donc d'obtenir une extinction plus prononcée de p53. Les différents contrôles réalisés (agent transfectant seul, siRNA NT) montrent que l'effet observé est bien dû au siRNA anti-p53 puisque ces conditions n'affectent pas l'abondance de la protéine p53.

En conclusion, la concentration de siRNA choisie est 50 nM car elle permet la meilleure inhibition de l'expression de p53. En ce qui concerne le délai post-transfection, celui de 24H fut choisi car il a été remarqué que les cellules souffraient après 48H. En effet, elles se détachaient plus facilement de la boîte, ce qui pourrait interférer dans les expériences ultérieures.

1.1.4 Evaluation de l'extinction de l'ARNm de p53 par PCR en temps réel et microdamiers « Human apoptosis »

But et description de l'expérience

Les résultats des expériences précédentes montrent que les siRNA anti-p53 engendrent une diminution importante de l'abondance de la protéine p53. Afin de vérifier que l'ARNm de p53 est effectivement dégradé par le siRNA, deux approches ont été utilisées, la PCR en temps réel et les microdamiers. D'autres ARNm que celui de TP53 furent analysés au cours de ces expériences, mais les résultats de ces analyses seront présentés au point 1.2.2.1 en ce qui concerne les microdamiers, et au point 1.2.2.2 pour la PCR en temps réel.

Les cellules sont repiquées dans des boîtes T75, à raison de trois millions par boîte, et transfectées pendant 24H. Après un repos de 8H, elles sont incubées 16H en présence ou en absence d'étoposide de concentration 50 μ M. Ensuite, une extraction d'ARN total est réalisée, suivie d'une rétro-transcription afin d'obtenir l'ADNc. La rétro-transcription réalisée pour la PCR en temps réel est différente de celle pour les microdamiers. En effet, pour les microdamiers, il y a incorporation de biotine afin de détecter l'ADNc hybridé. L'ADNc généré sera, selon le cas, mis en présence des amorces du gène à amplifier ou hybridé sur les microdamiers. Les conditions réalisées sont donc : le contrôle, le contrôle négatif avec le siRNA NT (50 nM) et la condition test avec les siRNA p53 50 nM, avec un délai post-transfection de 24H. La transfection en elle-même a une durée de 24H. D'autre part, ces conditions sont réalisées en double, une des deux séries ayant été incubée en présence d'étoposide pendant 16H, l'autre pas. L'étoposide augmente l'abondance de p53 en inhibant sa dégradation et en augmentant la transcription du gène qui l'encode. Il sera alors possible de vérifier que l'extinction de p53 est toujours aussi efficace, même quand la protéine est plus abondante au départ.

Analyse des résultats

Les résultats sont représentés sur le graphique de la **figure 4**. Plusieurs conclusions peuvent être tirées de ce graphique. Tout d'abord, les paramètres choisis, c'est-à-dire une concentration de 50 nM et un délai post-transfection de 24 H, engendrent une extinction de 90 % de l'expression de l'ARNm de p53, ce qui confirme les résultats obtenus au niveau protéique. De plus, le siRNA anti-p53 engendre également une forte extinction de cet ARNm lorsque son expression est augmentée en présence d'étoposide.

Il faut cependant noter que, dans cette expérience, le siRNA NT a un effet perturbateur sur l'expression de l'ARNm de p53, surtout dans la condition avec étoposide. Cet effet est observé aussi bien quand l'expression de l'ARNm est analysée par PCR en temps réel que par microdamiers. Ceci est probablement dû à un effet non spécifique.

La comparaison des résultats obtenus à l'aide des deux techniques montre que le fold d'induction obtenu par la PCR en temps réel est souvent plus haut que celui quantifié par l'analyse des microdamiers. Ceci est probablement dû au fait que le « dynamic range » de l'analyse par microdamiers est moins important que celui de la PCR en temps réel. Les résultats restent cependant comparables.

1.1.5 Conclusion

En conclusion, les résultats des expériences décrites ci-dessus montrent qu'une concentration de 50 nM en siRNA anti-p53 et un délai post-transfection de 24H permettent d'obtenir une extinction optimale de la protéine p53, parallèle à une diminution importante de la quantité d'ARNm de p53. L'utilisation d'une concentration en siRNA anti-p53 plutôt faible procure un avantage financier, mais permet surtout de limiter les effets non-spécifiques des siRNA. L'extinction observée est bien due à un effet spécifique du siRNA et il n'y a pas

d'effet traumatisant de la transfection. Ces conditions seront donc utilisées dans la suite de ce travail.

1.2 Effet de l'extinction de p53 sur l'expression de ses effecteurs

1.2.1 Introduction

Ayant mis au point les conditions expérimentales pour obtenir une extinction optimale de p53, nous allons maintenant suivre l'effet de cette extinction sur l'expression des effecteurs de p53. En effet, la finalité de p53 est d'induire la réparation des dégâts produits à l'ADN ou, si cela est impossible, de déclencher l'apoptose de la cellule. Ces actions ne peuvent être réalisées que si l'expression de certains gènes, et par la suite le niveau des protéines correspondantes, sont augmentés. C'est pour cette raison que nous allons caractériser l'effet de l'extinction de p53 sur l'expression de certains de ses gènes cibles. Ensuite, la quantité de protéine correspondante sera évaluée pour confirmer les changements d'expression observés au niveau des ARNm.

1.2.2 Effet de l'extinction de p53 sur l'expression de ses gènes cibles

1.2.2.1 *Evaluation par microdamiers « Human Apoptosis »*

But et description de l'expérience

Le but de cette expérience est de visualiser l'effet de l'extinction de p53 sur l'expression de différents gènes, et plus particulièrement de ceux connus pour être des gènes cibles de ce facteur de transcription. On peut s'attendre à ce que leur expression soit induite par l'étoposide et éteinte en présence du siRNA anti-p53.

Les cellules sont repiquées dans des boîtes T75 (trois millions de cellules par boîte) puis transfectées pendant 24H. Après 8H de repos, la moitié des boîtes T75 sont incubées 16H en présence d'étoposide, l'autre moitié est incubée dans les mêmes conditions mais sans étoposide. Une fois l'extraction d'ARN et la rétro-transcription en ADNc réalisées, l'ADNc est hybridé sur les microdamiers. Ceux-ci sont ensuite scannés et analysés à l'aide des logiciels fournis par Eppendorf. Les conditions réalisées sont les suivantes : le contrôle, le contrôle négatif (siRNA NT) et la condition test avec le siRNA anti-p53. Ces conditions sont réalisées en double, une série seulement étant incubée en présence d'étoposide.

Analyse des résultats

Les résultats complets de l'analyse sont présentés dans l'annexe 2. Le tableau de la **figure 5** regroupe les valeurs de fold d'induction de l'expression de quelques gènes d'intérêt pour lesquels une variation significative d'expression a été détectée. Ils peuvent être classés en deux catégories : ceux dont l'expression est dépendante de p53 et ceux dont l'expression est indépendante de p53. Les gènes de la première catégorie sont ceux dont l'expression dépend de p53. En effet l'étoposide influence l'expression de ces gènes, que ce soit en augmentant (A) leur expression ou en la diminuant (B), et le siRNA anti-p53 inhibe l'effet de

l'étoposide sur leur expression. Par contre, les gènes de la deuxième catégorie sont ceux dont l'expression est indépendante de p53. Effectivement, ni le siRNA anti-p53, ni l'étoposide n'ont d'effet sur leur expression.

Plus particulièrement, les graphiques de la **figure 6** reprennent les résultats concernant l'expression de certains gènes cibles de p53. Dans le graphique A, l'expression des ARNm codant pour p21, Bax et GPX-1 est quantifiée. Ceux-ci sont connus pour être des gènes cibles de p53 et leur expression est effectivement augmentée en présence d'étoposide. De plus, le siRNA anti-p53 diminue le niveau d'ARNm de ces gènes, surtout lorsqu'il est induit par l'étoposide. Le siRNA NT n'a pas d'effet sur l'expression de ces gènes.

Dans le graphique B, les résultats pour les ARNm des gènes codant pour Gadd45, p53 et Bak sont illustrés. Gadd45 est un gène connu comme cible de p53 mais son expression n'est pas augmentée par l'étoposide dans nos conditions expérimentales. Par contre, le siRNA anti-p53 diminue bien le niveau de son ARNm, ce qui montre que son expression est dépendante de p53. Le gène de Bak n'est, quant à lui, pas connu comme étant une cible de p53. Cependant, les changements d'expression de son ARNm sont tout à fait similaires à ceux observés pour les ARNm de p21, Bax et GPX-1, qui sont des gènes cibles de p53. Ces résultats suggèrent que ce gène serait également un gène cible de p53. Enfin, le gène codant pour p53 lui-même est induit par l'étoposide. Son expression au niveau ARNm est également diminuée par le siRNA anti-p53, ce qui serait le signe d'une rétro-action positive.

Notons que le siRNA NT a parfois un léger effet sur l'expression de ces ARNm dans plusieurs conditions. Il a par exemple un effet sur l'expression des ARNm des gènes de p21 et p53, en présence d'étoposide.

1.2.2.2 Evaluation par PCR en temps réel

But et description de l'expérience

Les analyses par microdamiers génèrent une quantité importante de données. Afin de valider les résultats obtenus avec les microdamiers, nous avons décidé de quantifier l'abondance des ARNm encodant les gènes qui nous semblaient les plus intéressants dans cette étude, à savoir : Gadd45, GPX-1, Bak, p21 et Bax. Cette validation s'est faite à l'aide de RT-PCR en temps réel.

L'expérience s'est déroulée comme présenté au point 1.1.4. Les conditions réalisées sont toujours les mêmes, à savoir le contrôle, le contrôle négatif (siRNA NT) et la condition test avec le siRNA anti-p53. Ces conditions sont réalisées en double, une série étant incubée en présence d'étoposide, et l'autre sans pendant 16H.

Analyse des résultats

Les résultats sont présentés sous la forme de graphiques dans la **figure 7**. Ceux-ci sont mis en parallèle avec les résultats obtenus avec les microdamiers afin de faciliter la comparaison. En général, les résultats obtenus avec les microdamiers sont confirmés par les différentes analyses par PCR en temps réel. Effectivement, l'étoposide augmente l'expression des ARNm encodant Gadd45, GPX-1, Bak, p21 et Bax. De plus, le siRNA p53 inhibe bien l'expression des ARNm des gènes, en présence d'étoposide plus particulièrement. Comme expliqué au point 1.2.2.1, p53 est stabilisé par l'étoposide et donc son inhibition a un plus grand impact sur l'expression de ses gènes cibles en présence d'étoposide. L'effet est donc plus marqué en présence d'étoposide.

L'expression du gène encodant la protéine Bak a également été analysée afin de confirmer sa dépendance vis-à-vis de p53 en utilisant une technique différente. Les résultats montrent, une fois de plus, que l'expression de Bak est induite par l'étoposide et cet effet est à nouveau supprimé par le siRNA anti-p53. Ces résultats correspondent bien à ceux obtenus avec les microdamiers et suggèrent que Bak est un gène cible de p53, comme le sont Gadd45, GPX-1, Bax et p21.

En ce qui concerne la comparaison des deux expériences, il y a quelques différences entre les résultats des PCR en temps réel et ceux obtenus à l'aide des microdamiers. Par exemple, pour le gène de Gadd45, dans les conditions sans étoposide, le siRNA anti-p53 inhibe l'expression du gène selon les résultats des microdamiers. Par contre, en suivant les résultats des PCR en temps réel, le siRNA anti-p53 ne semble pas inhiber l'expression de ce gène. La technique des microdamiers est un peu moins précise que celle de la PCR en temps réel. Effectivement, elle nécessite un plus grand nombre d'étapes et certaines de ces étapes sont plus facilement contrôlables au cours d'une PCR en temps réel qu'au cours d'une hybridation sur microdamiers. Les résultats obtenus par les PCR en temps réel seraient donc plus proches de la réalité que ceux obtenus par les microdamiers. De plus, le fold d'induction observé avec la PCR en temps réel est souvent plus élevé que celui observé avec les microdamiers. Cela peut être expliqué par le fait que le « dynamic range » de la PCR en temps réel est plus grand que celui des microdamiers.

1.2.3 Effet de l'extinction de p53 sur l'expression des protéines encodées par ses gènes cibles

But et description de l'expérience

Le but de cette expérience est de vérifier que l'effet de l'extinction de p53 sur l'expression de l'ARNm de ses gènes cibles se répercute effectivement sur l'abondance des protéines correspondantes. En effet, p53, en tant que facteur de transcription, augmente l'expression de certains gènes, mais ce sont les protéines qui sont les effecteurs. Il est donc important, le but étant d'inhiber l'action de p53, que l'effet soit aussi présent sur l'expression des protéines, et pas uniquement au niveau des ARNm.

En pratique, les cellules sont repiquées dans des boîtes T25 à raison de un million de cellules par boîte, puis transfectées pendant 24H. Après 8H de repos, elles sont incubées, selon les conditions, en hypoxie ou normoxie, en présence ou pas d'étoposide pendant 16H. Pour finir, les extraits protéiques totaux sont récoltés afin de réaliser le Western-Blot. Les conditions sont le contrôle, le contrôle négatif et la condition test avec le siRNA anti-p53. Elles sont réalisées en quatre séries, la première série est incubée en normoxie, sans étoposide (Nx) ; la deuxième est aussi incubée en normoxie mais en présence d'étoposide (Ne) ; la troisième série est incubée en hypoxie, sans étoposide (Hx) ; et finalement, la dernière série est incubée en hypoxie avec étoposide (He).

Les conditions incubées en hypoxie sont réalisées dans le but de visualiser l'effet que l'hypoxie a sur l'expression des protéines encodées par les gènes cibles de p53. En effet, dans la suite de ce travail, nous étudierons l'effet de l'hypoxie sur l'apoptose déclenchée en présence d'étoposide dans le but de comprendre le rôle de p53. Il est donc important de connaître l'abondance des différents effecteurs dont il contrôle l'expression.

Analyse des résultats

Les résultats des différentes analyses en Western-Blot sont présentés à la **figure 8**. Pour chaque protéine étudiée, un contrôle de charge est réalisé en révélant l' α -tubuline. Les protéines étudiées sont Bak, Bax et p21. Les protéines Bax et p21 ont été choisies car elles sont encodées par un gène cible de p53 bien connu. Par contre, Bak fut choisi afin de confirmer l'effet du facteur de transcription p53 sur son expression mis en évidence précédemment.

Le Western-Blot pour Bax montre que l'expression de cette protéine est induite par l'étoposide, aussi bien en normoxie qu'en hypoxie. La présence du siRNA anti-p53 provoque une diminution de sa quantité, que ce soit en normoxie, en hypoxie, en présence ou pas de l'étoposide. L'effet observé au niveau du gène de Bax est donc toujours présent au niveau des protéines. Dans ce cas-ci, il est difficile d'observer une différence dans la quantité de protéines en comparant le niveau de Bax en hypoxie-étoposide par rapport à la normoxie-étoposide, dans les conditions non-transfectées. L'hypoxie seule semble, quant à elle, augmenter l'abondance de Bax.

En ce qui concerne la protéine p21, les mêmes effets sont observés que pour la protéine Bax, c'est-à-dire que l'étoposide induit l'expression de p21 et que le siRNA anti-p53 inhibe cet effet. Par contre, en comparant l'hypoxie-étoposide et la normoxie-étoposide, une diminution de la quantité de protéine peut être remarquée, ce qui signifierait que son expression est diminuée par l'hypoxie, en présence d'étoposide. Le même effet est observé sans étoposide.

Enfin, la protéine Bak subit les mêmes variations d'expression que Bax ou p21 (induite en étoposide, diminuée en présence du siRNA anti-p53). La comparaison entre l'hypoxie-étoposide et la normoxie-étoposide aboutit aux mêmes conclusions que pour p21. En effet, la quantité de protéine Bak diminue en hypoxie, que ce soit avec ou sans étoposide, par rapport au contrôle normoxie correspondant.

Ces observations montrent que le siRNA anti-p53 inhibe l'expression des protéines de trois gènes cibles, ou présumés cibles, de p53 : p21, Bax et Bak. L'étoposide induit l'expression de ces trois protéines. D'autre part, l'hypoxie n'a pas le même effet sur cette expression : elle inhibe l'expression de Bak et de p21 mais semble augmenter celle de Bax.

1.3 Etude de l'effet de l'extinction de p53 sur l'apoptose induite par l'étoposide, en normoxie et en hypoxie

1.3.1 Introduction

Après avoir mis au point les différents paramètres afin d'obtenir une extinction optimale de la protéine p53, les effets de cette extinction ont été observés sur l'expression de ses gènes cibles, aux niveaux ARNm et protéique. Pour rappel, il est connu que l'hypoxie protège les cellules HepG2 de l'apoptose induite par l'étoposide, cependant le mécanisme de cette protection reste inconnu. Une hypothèse possible est que l'hypoxie diminue la quantité de p53 et ainsi diminue l'apoptose. Pour vérifier cette hypothèse, nous allons étudier l'effet de l'extinction artificielle de p53 à l'aide du siRNA sur l'apoptose induite par l'étoposide.

Il a déjà été observé que le niveau des protéines encodées par des gènes cibles de p53 était diminué dans les cellules incubées sous hypoxie, en présence d'étoposide comparé aux cellules incubées en normoxie, en présence d'étoposide. La suite de ce travail se concentre donc sur les effets de l'extinction sur l'apoptose et non plus sur les cibles de p53, l'apoptose étant, en fait, une conséquence de l'activation de p53 par l'étoposide.

1.3.2 Evaluation de l'abondance de p53

Avant de suivre l'apoptose proprement dite, nous avons suivi l'abondance de la protéine p53 dans les différentes conditions expérimentales. La **figure 9** présente les résultats obtenus lors de l'analyse par Western-Blot de l'abondance de p53. En normoxie, la protéine p53 est induite par l'étoposide. En hypoxie, par contre, elle n'est pas détectée. Cette absence pourrait être justifiée par le fait que p53 est dégradé en hypoxie. Le siRNA anti-p53 diminue fortement l'abondance de la protéine en présence et en absence d'étoposide alors que le siRNA NT n'a pas d'effet. Ces résultats confirment l'effet inhibiteur de l'hypoxie sur l'expression protéique de p53.

1.3.3 Evaluation par un dosage de l'activité de la caspase 3

But et description de l'expérience

Le dosage de l'activité de la caspase 3 permet d'évaluer le niveau d'apoptose dans les cellules. En effet, la caspase 3 est un des effecteurs de l'apoptose initiée par la voie intrinsèque, donc par p53. Elle clive divers substrats comme PARP, ce qui mène à la fragmentation de l'ADN et la formation de corps apoptotiques. Grâce à cette évaluation, l'effet de l'inhibition de l'expression de p53 pourra être observé selon les différentes conditions, et notamment, en hypoxie, en présence d'étoposide. Cela nous permettra de visualiser le rôle que joue la protéine p53 dans la protection contre l'apoptose, procurée par l'hypoxie.

Les cellules sont repiquées dans des boîtes 6 puits à raison de 250 000 cellules par puits. Elles sont ensuite transfectées avec le siRNA anti-p53 à une concentration de 50 nM pendant 24H. Après un repos de 8H, les cellules sont incubées 16H en normoxie, normoxie étoposide, hypoxie et hypoxie étoposide. Une extraction des protéines est réalisée et un dosage de l'activité de la caspase 3 est effectué. Celui-ci se réalise grâce au substrat Ac-DEVD-AFC clivé par la caspase 3 active entre le résidu D et le fragment fluorescent AFC. L'activité de la caspase 3 est donc évaluée en mesurant l'intensité de fluorescence émise par le substrat clivé.

Analyse des résultats

La **figure 10** présente sous forme graphique les résultats du dosage de l'activité de la caspase 3. Premièrement, on observe l'effet stimulateur de l'étoposide sur l'activité de la caspase 3. La condition contrôle des cellules incubées en normoxie-étoposide montre bien une augmentation de l'apoptose par rapport à la condition contrôle en normoxie.

Deuxièmement, nous observons la protection de l'apoptose, procurée par l'hypoxie, aux cellules HepG2, en présence d'étoposide. En effet, en comparant les conditions normoxie-étoposide et hypoxie-étoposide dans les conditions contrôles, une diminution de l'activité de la caspase 3 est observée. L'apoptose est donc diminuée en condition d'hypoxie.

De manière intéressante, la condition avec le siRNA anti-p53, en normoxie-étoposide, montre que l'apoptose induite par l'étoposide est bien médiée par p53. En effet, le niveau d'activité de la caspase 3 diminue fortement, par rapport au contrôle en normoxie-étoposide,

quand l'expression de p53 est inhibée par le siRNA anti-p53. Le siRNA NT n'a pas d'effet. La protéine p53 est donc nécessaire au déclenchement de l'apoptose en présence d'étoposide.

Pour finir, ce graphique nous permet d'observer l'effet de l'extinction de la protéine p53 sur l'apoptose induite par l'étoposide, en condition d'hypoxie. Il semble que cette extinction n'ait pas d'effet sur l'apoptose induite par l'étoposide, en hypoxie. En fait, le niveau d'activité de la caspase 3 est le même, que p53 soit présent (condition contrôle en hypoxie-étoposide) ou pas (condition siRNA p53 en hypoxie-étoposide). Cette observation coïncide avec l'hypothèse de départ selon laquelle l'hypoxie protège les cellules HepG2 de l'apoptose induite par l'étoposide, en hypoxie, en diminuant la quantité de p53. En effet, il serait alors normal que le niveau de la protéine p53 dans la condition contrôle (hypoxie-étoposide) soit proche de celui observé quand les siRNA anti-p53 sont utilisés et donc l'induction de l'apoptose est la même dans les deux conditions. Cette observation reste bien sûr à être confirmée grâce à d'autres expériences.

1.3.4 Evaluation du clivage de la protéine PARP par Western-Blot

But et description de l'expérience

Le but de cette expérience est de confirmer les résultats obtenus dans l'expérience précédente en utilisant une autre approche visant à évaluer le niveau d'apoptose. La technique choisie est la détection du clivage de la protéine PARP par Western-Blot. Cette protéine est une enzyme de réparation de l'ADN qui est clivée par la caspase 3. Ce clivage a pour but d'inactiver PARP et de permettre la poursuite du processus d'apoptose. La quantité de fragment PARP clivé est donc proportionnelle à l'activité de la caspase 3 et donc à l'apoptose.

Les cellules sont repiquées dans des boîtes T25 à raison de 1 million par boîte. Après une transfection de siRNA anti-p53 durant 24H, elles sont laissées au repos pour 8H. Elles sont ensuite incubées sous hypoxie ou normoxie, en présence ou pas d'étoposide, pendant 16H. Pour finir, une extraction protéique totale est effectuée afin de réaliser le Western-Blot. Les conditions sont : le contrôle, le contrôle négatif et la condition test avec le siRNA anti-p53. Celles-ci sont réalisées quatre fois, une série incubée en normoxie, sans étoposide ; une autre incubée en normoxie, avec étoposide ; la troisième incubée en hypoxie, sans étoposide et pour finir, la dernière incubée en hypoxie, avec étoposide.

Analyse des résultats

Les résultats sont illustrés à la **figure 11**. Le fragment clivé de PARP, ayant une taille de 85 kDa, également nommé p85, est plus abondant dans les conditions normoxiques, en présence d'étoposide par rapport à la condition normoxie seule, ce qui indique bien l'induction de l'apoptose. En normoxie, sans étoposide, le fragment clivé de PARP n'est pas détecté. En présence du siRNA anti-p53, l'intensité de la bande est moindre, alors que le siRNA NT n'a pas d'effet. Ces résultats indiquent, comme dans l'expérience précédente, que p53 est nécessaire à l'induction de l'apoptose en présence d'étoposide. En effet, en comparant ces observations avec l'abondance de p53, la baisse de niveau de PARP clivé correspond à la baisse du niveau de la protéine p53. Cela signifie qu'en présence d'étoposide, le niveau

d'apoptose est corrélé avec le niveau de la protéine p53. En hypoxie, seule la protéine PARP entière est détectée. L'hypoxie seule n'induit donc pas d'apoptose. On observe une fois de plus la protection apportée par l'hypoxie, en présence d'étoposide. En effet, il n'y a pas de fragment clivé de PARP en hypoxie-étoposide, alors qu'en normoxie-étoposide, il est bien présent. Comme le fragment clivé de PARP n'est pas détecté en hypoxie-étoposide, on n'observe pas d'effet du siRNA anti-p53.

1.3.5 Conclusion

Ces résultats montrent que l'hypoxie protège les cellules HepG2 de l'apoptose induite par l'étoposide : on observe en effet une diminution de l'augmentation de l'activité de la caspase 3 et du clivage de PARP. Une diminution de l'abondance de p53 est observée en parallèle. L'hypothèse serait donc que l'hypoxie protège les cellules HepG2 de l'apoptose induite par l'étoposide en diminuant la quantité de p53.

Nous avons voulu vérifier cette hypothèse en diminuant de manière artificielle la quantité de p53 dans les cellules incubées en présence d'étoposide, ceci fut réalisé à l'aide de siRNA. Les résultats montrent que si la quantité de p53 est réduite par le siRNA anti-p53, l'apoptose est effectivement diminuée : on observe en effet une diminution de l'activité de la caspase 3 et du clivage de PARP. Ils indiquent donc que notre hypothèse de départ pourrait être correcte et que c'est en diminuant la quantité de p53 que l'hypoxie protège les cellules HepG2 de l'apoptose induite par l'étoposide.

2. Etude de l'effet de l'inhibition de la protéine pro-apoptotique Bak sur l'apoptose induite par l'étoposide

2.1 Introduction

Les résultats précédents suggèrent que p53 est impliquée dans l'induction de l'apoptose induite par l'étoposide et que la protection apportée par l'hypoxie passe par une inhibition de cette protéine. p53 est un facteur de transcription qui régule l'expression de nombreux gènes. Nous avons donc voulu savoir quel(s) serai(en)t le ou les gènes cibles régulés par p53 qui sont effectivement responsables de l'induction de l'apoptose dans notre modèle expérimental et donc une inhibition d'expression de ce ou ces gènes, soit en présence du siRNA anti-p53, soit en hypoxie, conduirait à une inhibition de l'apoptose.

Nous avons choisi d'étudier la protéine Bak pour deux raisons : premièrement, cette protéine n'a jamais été décrite comme encodée par un gène cible de p53, or nos résultats suggèrent qu'elle le serait. Deuxièmement, son expression au niveau protéique est diminuée en hypoxie (voir **figure 8**). Nous allons donc étudier l'effet de l'extinction de Bak sur l'apoptose induite par l'étoposide, en normoxie et hypoxie. Si l'apoptose est diminuée avec le siRNA anti-Bak, cela voudra dire que p53 induit l'apoptose au moins en partie via une augmentation de l'expression de cette protéine pro-apoptotique.

L'inhibition de l'expression de Bak est réalisée grâce à un « smart pool » de siRNA anti-Bak. Pour que celle-ci soit efficace, il faut, comme pour le siRNA anti-p53, mettre au point les paramètres de transfection. Se basant sur les résultats obtenus avec le « smart pool » de siRNA anti-p53, un seul délai post-transfection est testé, celui de 24H. Par contre, différentes concentrations ont été testées : 10 nM, 20 nM et 50 nM. Les contrôles réalisés sont à nouveau le contrôle sans ajout d'agent transfectant et de siRNA, et le contrôle négatif (siRNA NT).

2.2 Mise au point de l'inhibition de l'expression de Bak

2.2.1 Evaluation par Western-Blot

But et description de l'expérience

Le but de cette expérience est de visualiser l'efficacité de la transfection des siRNA anti-Bak en fonction des différentes concentrations. Celle pour laquelle l'extinction de la protéine Bak est optimale sera choisie pour continuer la suite des expériences. L'extinction de la protéine résultant de la transfection est évaluée par la technique du Western-Blot, qui permet d'évaluer de manière semi-quantitative l'abondance de la protéine Bak.

Les conditions réalisées sont la condition test avec les siRNA anti-Bak de concentration 10 nM, une autre avec une concentration de 20 nM et la dernière de 50 nM. Le contrôle et le contrôle négatif (siRNA NT 50 nM) sont également effectués. Ces conditions sont faites en double, une série étant incubée en présence d'étoposide, afin de vérifier que l'extinction est aussi efficace en présence d'étoposide, qui augmente l'abondance de la protéine.

Les cellules sont repiquées dans des boîtes T25 à raison d'un million par boîte. Elles sont ensuite transfectées pendant 24H à l'aide de l'agent transfectant DharmaFECT 1. Après un repos de 8H, elles sont incubées avec ou sans étoposide (50 μ M) pendant 16H, puis les protéines sont extraites afin de réaliser le Western-Blot. Le contrôle de charge utilisé est l' α -tubuline.

Analyse des résultats

Les résultats de l'analyse par Western-Blot sont présentés à la **figure 12**. D'une manière générale, une forte extinction de la protéine Bak est observée en présence des différentes concentrations en siRNA. Le contrôle négatif siRNA NT n'a pas d'effet. Toutes les concentrations engendrent plus de 80 % d'extinction.

L'étoposide augmente fortement l'expression de la protéine Bak. Néanmoins, l'inhibition de l'expression de Bak en présence de siRNA anti-Bak est toujours aussi efficace. Au vu de ces résultats, nous avons décidé de choisir la concentration de 50 nM, par analogie aux expériences réalisées avec le siRNA anti-p53, l'extinction de la protéine étant optimale avec cette concentration.

2.2.2 Evaluation par PCR en temps réel

But et description de l'expérience

Afin de vérifier que la quantité de l'ARNm du gène codant pour Bak est également diminuée de façon importante, une analyse par PCR en temps réel a été réalisée.

Les cellules sont repiquées dans des boîtes T75 à raison de trois millions par boîte et transfectées pendant 24H. Après 8H de repos, la moitié des boîtes est incubée en présence d'étoposide pendant 16H, et l'autre sans. L'extraction d'ARN total est ensuite réalisée, suivie de la rétro-transcription en ADNc. Cette ADNc est alors utilisée pour la PCR en temps réel. Les conditions sont : le contrôle, le contrôle négatif, et la condition test avec le siRNA anti-Bak à une concentration de 50 nM. Notons que le contrôle négatif utilisé dans ce cas-ci est un siRNA RISC-free, différent du siRNA NT. Ce contrôle négatif est apparu récemment sur le marché. Il n'est pas pris en charge par le complexe RISC et ne devrait donc pas avoir d'effet sur les cellules. Ce changement a été décidé suite à l'observation faite durant plusieurs expériences dans lesquelles un effet non spécifique du siRNA NT avait été détecté.

Analyse des résultats

Les résultats sont représentés à la **figure 13**. Ils montrent que l'expression de l'ARNm encodant Bak est augmentée de 3,5 fois en présence d'étoposide. Le siRNA anti-Bak, à une concentration de 50 nM, entraîne une diminution de plus de 80% de la quantité d'ARNm du gène codant pour Bak, que ce soit en absence ou en présence d'étoposide. De plus, le siRNA RISC-free utilisé pour le contrôle négatif ne provoque aucun effet sur l'abondance du message, que ce soit avec ou sans étoposide.

En conclusion, la concentration de 50 nM permet bien une extinction efficace de l'ARNm de Bak. C'est donc cette concentration qui sera utilisée pour la suite des expériences. De plus, le contrôle négatif montre que l'effet est bien dû au siRNA anti-Bak, et non pas à un effet traumatisant de la transfection, ou à un effet non-spécifique du siRNA.

2.3 Effet de l'extinction de Bak sur l'apoptose induite par l'étoposide, en normoxie et en hypoxie

2.3.1 Evaluation par dosage de l'activité de la caspase 3

But et description de l'expérience

La mise au point des conditions d'extinction de la protéine Bak étant réalisée, l'effet de celle-ci a été étudié au niveau de l'apoptose induite par l'étoposide. Pour rappel, l'hypothèse est qu'en inhibant l'expression d'une protéine pro-apoptotique encodée par un gène cible de p53, comme Bak, l'apoptose induite par l'étoposide devrait être inhibée si cette protéine est impliquée dans l'induction de l'apoptose.

Les cellules sont repiquées dans des plaques 6 puits, à raison de 250 000 cellules par puits, et transfectées pendant 24H. Après 8H de repos, les cellules sont incubées sous hypoxie ou normoxie, avec ou sans étoposide pendant 16H. Pour finir, une extraction protéique est réalisée, afin de pouvoir doser l'activité de la caspase 3. Ce dosage s'effectue à l'aide du substrat Ac-DEVD-AFC (le principe est expliqué au point 1.3.2). Rappelons juste que l'activité de la caspase 3 est visualisée par l'intensité de fluorescence émise par le substrat clivé. Les conditions réalisées sont : le contrôle, le contrôle négatif (siRNA RISC-free) et la condition test avec le siRNA anti-Bak (50 nM). Quatre séries sont effectuées afin d'obtenir, pour chaque condition, une incubation en normoxie avec étoposide, normoxie seule, hypoxie avec étoposide et hypoxie seule.

Analyse des résultats

Les résultats sont représentés sous forme graphique à la **figure 14**. En normoxie, sans étoposide, l'absence de la protéine Bak ne semble pas, ou peu, influencer l'activité basale faible de la caspase 3. Par contre, en présence d'étoposide qui augmente fortement l'activité de la caspase 3, l'inhibition de l'expression de Bak provoque une diminution nette de cette activité. Pour rappel, l'apoptose induite par l'étoposide est médiée par p53 (puisque l'inhibition de l'expression de p53 inhibe l'activation de la caspase 3 par l'étoposide), or si l'extinction de Bak diminue cette apoptose, cela voudrait dire que Bak est effectivement impliqué dans l'induction de l'apoptose, en étant un des effecteurs de l'apoptose initiée par p53.

L'hypoxie seule n'a pas d'effet. En ce qui concerne les conditions d'hypoxie-étoposide, elles nous permettent de visualiser une fois de plus la protection que procure l'hypoxie contre l'apoptose induite par l'étoposide. Le siRNA anti-Bak diminue également l'activité de la caspase 3 en hypoxie-étoposide. Ces résultats suggèrent que Bak est une protéine pro-apoptotique impliquée dans l'initiation de l'apoptose induite par l'étoposide.

2.3.2 Evaluation par Western-Blot

But et description de l'expérience

Cette expérience est réalisée dans le but de confirmer l'effet de l'extinction de Bak sur l'apoptose induite par l'étoposide par une autre technique que le dosage de l'activité des caspases 3. Pour cela, une analyse par Western-Blot est effectuée afin de visualiser le clivage de PARP (substrat de la caspase 3).

Les cellules sont d'abord repiquées en boîtes T25 (un million par boîte) puis transfectées pendant 24H. Après un repos de 8H, elles sont incubées en normoxie, avec ou sans étoposide pendant 16H. L'extraction protéique totale est finalement effectuée afin de réaliser le Western-Blot. Le contrôle de charge utilisé est l' α -tubuline et les conditions testées sont le contrôle, la condition avec le siRNA anti-Bak et le contrôle négatif (siRNA RISC-Free, RF).

Analyse des résultats

Les résultats de cette expérience sont présentés à la **figure 15**. En ce qui concerne PARP, on observe une augmentation de l'abondance du fragment clivé, qui correspond à une

augmentation de l'apoptose, en normoxie en présence d'étoposide. En outre, l'extinction de la protéine Bak, provoquée par le siRNA anti-Bak, diminue l'abondance du fragment clivé de PARP, en présence d'étoposide. Cette observation confirme les résultats obtenus avec le dosage de l'activité de la caspase 3 et suggère à nouveau que Bak est impliqué dans l'initiation de l'apoptose induite par l'étoposide. On observe à nouveau que l'hypoxie inhibe cette apoptose puisque le fragment de 85kDa de PARP n'est pas détecté en hypoxie-étoposide. Le siRNA RF ayant un effet dans le cas des conditions hypoxiques, les résultats concernant celles-ci sont difficilement interprétables en ce qui concerne l'effet du siRNA anti-Bak.

2.4 Conclusion

L'ensemble de ces résultats indiquent que la protéine Bak est indispensable pour l'initiation de l'apoptose induite par l'étoposide. En effet, lorsque son expression est inhibée, on observe une diminution de l'activité de la caspase 3 et de la fragmentation de PARP. Comme son expression est augmentée en présence d'étoposide et que cette expression est fortement diminuée lorsque l'expression de p53 est inhibée, on peut supposer que c'est en augmentant l'expression de Bak que p53 induit l'apoptose en présence d'étoposide. En hypoxie, l'expression de p53 et celle de Bak sont diminuées, le tout en parallèle avec une inhibition de l'apoptose induite par l'étoposide. C'est donc probablement en diminuant l'expression, donc l'activité de p53 et en conséquence l'expression de Bak, que l'hypoxie apporte sa protection. C'est la première fois qu'un tel mécanisme est identifié en hypoxie.

IV. Conclusions et Perspectives

Les cellules tumorales hypoxiques présentent une certaine résistance à la chimiothérapie utilisée dans le traitement des cancers. Par ailleurs, il a déjà été montré au laboratoire que l'hypoxie protège les cellules d'un hépatocarcinome humain (HepG2) de l'apoptose induite par une molécule utilisée en chimiothérapie, l'étoposide (Piret, Minet et al. 2005). Cependant, le mécanisme de cette protection reste inconnu. Plusieurs études ont été réalisées afin de comprendre ce phénomène de résistance. Par exemple, le rôle du facteur de transcription HIF-1 dans la protection contre l'apoptose procurée par l'hypoxie fut étudié. (Mémoire B. Vlaminc, 2006). Les résultats montrent que HIF-1 joue un rôle dans la régulation de l'expression de gènes impliqués dans l'apoptose. Par exemple, il semble qu'il diminue l'expression du gène encodant la protéine pro-apoptotique Bak. Néanmoins, il semblerait que d'autres facteurs interviennent. En effet, d'autres facteurs de transcription semblent être activés par l'hypoxie, comme NF- κ B, AP-1 ou p53 (Zhou, Schmid et al. 2006). C'est pour cette raison qu'il a été décidé d'étudier le rôle du facteur de transcription p53 dans cette protection. Notre hypothèse de départ est que l'hypoxie protège au moins en partie les cellules HepG2 de l'apoptose induite par l'étoposide en diminuant l'abondance de p53, en effet son expression est diminuée en hypoxie (mémoire K. Vannuvel, 2006). L'apoptose serait donc moindre car la diminution de p53 engendrerait une diminution de l'expression de ses effecteurs apoptotiques et donc de leurs effets.

Afin d'étudier le rôle de p53, nous avons décidé d'inhiber son expression grâce à des siRNA anti-p53 et d'étudier l'effet de cette inhibition sur l'apoptose induite par l'étoposide. Premièrement, nous avons mis au point l'inhibition de l'expression de p53. Différentes concentrations en siRNA furent testées et celle de 50 nM fut finalement choisie. De même, deux délais post-transfection furent testés : 24H et 48H. Le délai de 24H fut choisi car il est moins traumatisant pour les cellules tout en offrant une extinction équivalente. Ces paramètres ont été déterminés après avoir évalué l'extinction de p53 au niveau protéique et confirmé cet effet au niveau de l'ARNm. Le niveau d'ARNm fut évalué par PCR en temps réel et microdamiers, tandis que le niveau protéique fut évalué par Western-Blot et marquage en immunofluorescence. Dans les deux cas, les critères choisis ont mis en évidence une bonne extinction de l'expression de p53.

Ensuite, nous avons observé l'effet de l'extinction de p53 sur l'expression de ses gènes cibles, aussi bien au niveau des ARNm que des protéines. Le niveau d'ARNm fut évalué par PCR en temps réel et microdamiers, quant au niveau de protéines, il fut évalué par Western-Blot. De façon générale, l'expression des gènes cibles de p53 est inhibée en présence du siRNA anti-p53, que ce soit les ARNm ou les protéines. Cela montre que l'effet de l'extinction de p53 se répercute sur l'expression de ses gènes cibles.

Selon notre hypothèse, l'hypoxie diminue le niveau de p53, ce qui résulterait en une diminution de l'expression de ses gènes cibles. Il semble logique que la tumeur essaie de diminuer l'expression de ces gènes afin de pouvoir proliférer, car leurs produits sont essentiellement impliqués dans la régulation de la prolifération cellulaire. Ainsi, p21 est une protéine encodée par le gène CDKN1A (Cyclin-Dependent kinase Inhibitor 1A) qui est impliqué dans l'arrêt du cycle cellulaire. En tant qu'inhibiteur de la prolifération cellulaire, p21 joue un rôle important pour limiter la croissance des tumeurs (Gartel and Tyner 2002). De même, la protéine Gadd45, encodée par un gène cible de p53, est aussi impliquée dans l'arrêt du cycle cellulaire et dans la réparation de mutations de l'ADN. Le gène encodant GPX-1 est également une cible de p53, son expression est donc diminuée en présence du siRNA anti-

p53. GPX-1 fait partie de la famille des enzymes anti-oxydantes. Il permet, par exemple, la neutralisation de l' H_2O_2 en H_2O . Cette action a comme conséquence de diminuer la production de ROS (Reactive Oxygen Species) et donc de diminuer l'apoptose (Faucher, Rabinovitch-Chable et al. 2003). Enfin, l'expression de Bax est diminuée en l'absence de p53. Bax est une protéine pro-apoptotique de la famille Bcl-2 impliquée dans la perméabilisation de la mitochondrie. Toutes ces protéines participent donc à empêcher la croissance de la tumeur, soit en arrêtant le cycle cellulaire, soit en provoquant l'apoptose.

De manière intéressante, nous avons également remarqué, au cours des ces expériences, que l'expression du gène encodant la protéine Bak suivait les mêmes variations d'expression que des gènes cibles plus connus de p53, comme CDKN1A et Bax. Pourtant Bak n'a jamais été décrit dans la littérature comme étant un gène ciblé par p53. Il existe néanmoins un lien entre Bak et p53, mais indépendant de l'effet transcriptionnel de p53. En effet, p53 peut activer l'apoptose en interagissant directement avec Mcl-1, qui neutralise Bak en l'absence de stimuli pro-apoptotiques. Celui-ci est alors libre et peut induire l'apoptose (Yu 2006). L'effet observé au cours de cette expérience se produit au niveau de l'expression de l'ARNm et de la protéine Bak, il ne peut donc pas faire partie du mécanisme expliqué ci-dessus. Il est alors probable que Bak soit en fait encodé par un gène cible de p53, ce qui est une observation tout à fait nouvelle.

Afin de voir s'il existe dans le promoteur du gène de Bak une ou plusieurs séquences consensus qui permettraient la liaison de p53, une analyse via le logiciel TransFac fut réalisée. Le facteur de transcription p53 étant sous forme de tétramère, chaque monomère se lie à une séquence consensus, deux d'entre elles étant sur le brin positif et deux sur le brin négatif de l'ADN (Harris and Levine 2005). L'analyse par le logiciel TransFac a permis de découvrir deux possibilités de liaison de p53 sur un site p53 RE (Responsive Element) se trouvant dans le promoteur de Bak. Elles sont représentées à la **figure 1**.

Le prolongement de ce travail serait donc de réaliser des expériences visant à montrer que Bak est bien un gène cible de p53. L'analyse *in silico* de la séquence du promoteur de Bak a permis de mettre en évidence deux sites p53 RE putatifs. Pour vérifier la liaison de p53 aux sites identifiés, il serait nécessaire de cloner la séquence d'intérêt du promoteur de Bak dans un plasmide rapporteur. Pour confirmer que la liaison de p53 au site p53 RE putatif est bien responsable de l'expression du gène rapporteur, la mutation des sites p53 RE pourra également être envisagée. L'utilisation du siRNA anti-p53 sera également envisagée.

Dans la suite de cette première partie du travail, l'effet de l'extinction de p53 a été étudié sur l'apoptose induite par l'étoposide, en conditions d'hypoxie et de normoxie. Pour évaluer le niveau d'apoptose, nous avons tout d'abord mesuré l'activité de la caspase 3, puis nous avons observé le clivage de PARP (substrat de la caspase 3).

Les résultats ont permis de confirmer l'effet pro-apoptotique de l'étoposide. En effet, en présence d'étoposide, l'activité de la caspase 3 augmente considérablement, tout comme le clivage de PARP. La protection que procure l'hypoxie contre l'apoptose induite par l'étoposide est également mise en évidence grâce à ces expériences. L'activité de la caspase 3, mais aussi le clivage de PARP, diminuent fortement en hypoxie étoposide, par rapport à la normoxie étoposide. Ces deux observations avaient déjà été décrites dans la littérature (Piret, Minet et al. 2005). Par contre, l'implication de p53 dans l'apoptose induite par l'étoposide mise en évidence dans ces expériences est plus intéressante et nouvelle. En effet, en condition de normoxie, on observe une diminution de l'apoptose induite par l'étoposide quand l'abondance de p53 est réduite, suite à l'inhibition de son expression par le siRNA : une diminution de l'activité de la caspase 3 et une diminution du clivage de PARP sont en effet mises en évidence. Le déclenchement de l'apoptose par l'étoposide nécessite donc la protéine

p53. Cette observation permet de confirmer l'hypothèse de départ. En effet, si l'étoposide provoque l'apoptose via p53 et si il y a une diminution de la quantité de p53 en hypoxie (voir figure 9), l'hypoxie peut protéger les cellules en diminuant le niveau de p53, ce qui aboutirait donc à diminuer l'apoptose induite par l'étoposide.

Il est possible que p53 soit dégradé suite à une hypoxie de 16H. La caséine kinase 2 (CK2), dont l'expression et l'activité sont augmentées en hypoxie, pourrait être responsable de cette dégradation en phosphorylant p53 sur le résidu Ser392, ce qui ciblerait p53 vers une dégradation protéosomale (Hubert, Paris et al. 2006). Le dosage de l'activité de la caspase 3 permet de voir que le niveau d'activité de la caspase 3 est le même, en hypoxie étoposide avec ou sans siRNA anti-p53. L'inhibition de l'expression de p53 n'a donc pas d'effet sur l'apoptose induite par l'étoposide, en hypoxie, ce qui renforce notre hypothèse. On ne sait pas observer de protection en hypoxie avec le siRNA anti-p53 puisque p53 n'est plus présent, même sans siRNA.

De plus, diminuer le niveau de p53 procure un autre avantage à la tumeur. Il a été montré que p53 pouvait interagir avec la sous-unité α du facteur de transcription HIF-1. L'hypoxie sévère (anoxie) aurait pour effet de stabiliser p53, qui se lierait alors à HIF-1 α . Cette liaison, qui aurait lieu via le domaine ODD de HIF-1 α , ciblerait HIF-1 α vers une dégradation par le protéasome via MDM2 (Fels and Koumenis 2005). En hypoxie modérée, p53 n'est pas stabilisé et ne peut donc pas provoquer la dégradation de HIF-1 α . Ce dernier peut alors se lier à la sous-unité β et favoriser la survie de la tumeur. Dans la situation où la cellule est mise en présence d'étoposide, p53 devient stable, même en hypoxie modérée. HIF-1 α est alors dégradé et les conditions sont alors moins favorables pour la survie des cellules tumorales. Il est donc encore plus intéressant pour la tumeur de diminuer le niveau de p53 en condition hypoxique, quand elle est en présence d'étoposide : d'une part p53 n'induit pas l'apoptose et d'autre part, il n'induit pas de dégradation de HIF-1 α et HIF-1 peut servir de facteur favorisant la survie des cellules cancéreuses.

Dans la deuxième partie de ce travail, nous avons essayé de comprendre par quel(s) effecteur(s) p53 pouvait exercer son effet pro-apoptotique. p53 régule l'expression de différents gènes pro-apoptotiques. Par exemple, nous avons remarqué dans la première partie du travail que l'étoposide augmentait l'expression de l'ARNm de Bax et de Bak, de manière dépendante de p53 puisque inhibée en présence du siRNA anti-p53. Cependant, au niveau protéique, seule l'expression de Bak est diminuée en hypoxie, en parallèle à celle de p53 (voir figure 8). Il est donc plausible que ce soit Bak et non pas Bax qui soit, au moins en partie, un effecteur principal de l'effet pro-apoptotique de p53 qui est inhibé en hypoxie dans notre modèle expérimental. Afin de confirmer cette hypothèse, l'expression de Bak fut inhibée à l'aide d'un « smart-pool » de siRNA et l'effet de l'extinction de Bak sur l'apoptose induite par l'étoposide a été étudié. L'inhibition de l'expression de Bak a été mise au point en testant différentes concentrations en siRNA: 10, 20 et 50 nM. La concentration choisie est de 50 nM. Un seul délai post-transfection fut testé : 24H. Cette concentration induit une inhibition très importante de l'expression de Bak au niveau protéique et au niveau des ARNm.

L'effet de cette extinction sur l'apoptose induite par l'étoposide fut investigué en suivant l'activité de la caspase 3 et le clivage de PARP. Les résultats montrent que l'apoptose induite par l'étoposide est diminuée quand l'expression de la protéine Bak est inhibée par le siRNA anti-Bak. Cela montre que Bak est probablement un effecteur important de l'apoptose médiée par l'étoposide. Ces observations confirment l'hypothèse de départ. Bak serait donc bien un effecteur pro-apoptotique de l'apoptose induite par l'étoposide et comme son expression est régulée par p53, c'est probablement en diminuant p53, et donc Bak, que

l'hypoxie protège les cellules de l'apoptose induite par l'étoposide. L'ensemble de ces résultats est résumé à la **figure 2**.

Ces observations sont en concordance avec l'hypothèse émise par A. Sermeus selon laquelle l'hypoxie protège de l'apoptose induite par l'étoposide en diminuant l'expression des gènes encodant Bax et Bak. Cette hypothèse avait été émise sur base d'étude de profils d'expression de gènes et de mesures d'activité de facteurs de transcription. Nos observations permettent d'ajouter que la diminution de l'expression de Bax et Bak se ferait via une diminution de l'expression et de l'activité du facteur de transcription p53. En outre, le mémoire de B. Vlamincx avait montré que le facteur de transcription HIF-1, activé en réponse à l'hypoxie, diminue également l'expression de Bak. En conclusion, l'hypoxie protège de l'apoptose induite par l'étoposide en diminuant l'abondance du facteur de transcription p53, ce qui résulterait donc à une diminution de l'expression de Bax et Bak ; mais aussi en permettant la stabilisation et l'activation de HIF-1, qui diminue l'expression de Bak. Cet effet peut se situer en aval ou en parallèle de la diminution de p53 (voir **figure 3**).

Afin de compléter les informations apportées par ce travail, il serait intéressant de comprendre si l'effet du facteur de transcription HIF-1 est situé en aval ou en parallèle de l'effet de p53. Pour cela, il faudrait inhiber l'expression de HIF-1 α à l'aide d'un siRNA et observer l'effet de cette inhibition sur l'abondance de p53. Si l'extinction de HIF-1 α provoque une augmentation de l'expression de p53, cela voudrait dire que HIF-1 agirait en aval de p53, comme le suggère l'hypothèse 2 de la figure 3. Si tel n'est pas le cas, HIF-1 agirait en parallèle de p53 sur l'expression de Bak (hypothèse 1).

Il est important de noter que l'étoposide peut également induire l'apoptose dans des cellules ayant une version mutée de p53. Il semble donc qu'il y ait deux voies menant à l'apoptose en réponse à l'étoposide, une d'elles étant dépendante de p53 (Clifford, Beljin et al. 2003). La protection de l'hypoxie due à une diminution de p53 concerne donc les cellules « Wildtype », comme les HepG2 utilisées dans ce travail. Néanmoins, il faudrait maintenant étudier si des cellules ayant une version mutée de p53 présentent également cette protection procurée par l'hypoxie, en présence d'agent chimiothérapeutique. Par exemple, l'hypoxie protège les cellules provenant d'un cancer du poumon non à petites cellules, ayant une version mutée de p53, de l'apoptose provoquée par la cisplatine et la doxorubicine (Song, Liu et al. 2006). Il existe donc différents mécanismes par lesquels l'hypoxie protège certaines cellules cancéreuses de l'apoptose induite par différents agents chimiothérapeutiques.

En conclusion, ce travail a permis de mieux comprendre le mécanisme de protection de l'hypoxie. De plus, une nouvelle hypothèse a été formulée à la suite de ce mémoire selon laquelle le gène encodant la protéine Bak serait une cible de p53. L'identification d'une protéine jouant un rôle dans cette protection offre de nouvelles possibilités pour améliorer l'efficacité des chimiothérapies.

- Clifford, B., M. Beljin, et al. (2003). "G2 arrest in response to topoisomerase II inhibitors: the role of p53." Cancer Res **63**(14): 4074-81.
- Faucher, K., H. Rabinovitch-Chable, et al. (2003). "Overexpression of cytosolic glutathione peroxidase (GPX1) delays endothelial cell growth and increases resistance to toxic challenges." Biochimie **85**(6): 611-7.
- Fels, D. R. and C. Koumenis (2005). "HIF-1alpha and p53: the ODD couple?" Trends Biochem Sci **30**(8): 426-9.
- Gartel, A. L. and A. L. Tyner (2002). "The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis." Mol Cancer Ther **1**(8): 639-49.
- Hoh, J., S. Jin, et al. (2002). "The p53MH algorithm and its application in detecting p53-responsive genes." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(13): 8467-72.
- Hubert, A., S. Paris, et al. (2006). "Casein kinase 2 inhibition decreases hypoxia-inducible factor-1 activity under hypoxia through elevated p53 protein level." J Cell Sci **119**(Pt 16): 3351-62.
- Piret, J. P., E. Minet, et al. (2005). "Hypoxia-inducible factor-1-dependent overexpression of myeloid cell factor-1 protects hypoxic cells against tert-butyl hydroperoxide-induced apoptosis." J Biol Chem **280**(10): 9336-44.
- Song, X., X. Liu, et al. (2006). "Hypoxia-induced resistance to cisplatin and doxorubicin in non-small cell lung cancer is inhibited by silencing of HIF-1alpha gene." Cancer Chemother Pharmacol **58**(6): 776-84.
- Yu, Q. (2006). "Restoring p53-mediated apoptosis in cancer cells: new opportunities for cancer therapy." Drug Resist Updat **9**(1-2): 19-25.
- Zhou, J., T. Schmid, et al. (2006). "Tumor hypoxia and cancer progression." Cancer Lett **237**(1): 10-21.

V. Bibliographie

- Adams, J. M. (2003). "Ways of dying: multiple pathways to apoptosis." Genes Dev **17**(20): 2481-95.
- Adams, J. M. and S. Cory (2007). "The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy." Oncogene **26**(9): 1324-37.
- Ameltem, O. and E. O. Pettersen (1991). "Cell inactivation and cell cycle inhibition as induced by extreme hypoxia: the possible role of cell cycle arrest as a protection against hypoxia-induced lethal damage." Cell Prolif **24**(2): 127-41.
- Bardos, J. I. and M. Ashcroft (2005). "Negative and positive regulation of HIF-1: a complex network." Biochim Biophys Acta **1755**(2): 107-20.
- Bode, A. M. and Z. Dong (2004). "Post-translational modification of p53 in tumorigenesis." Nat Rev Cancer **4**(10): 793-805.
- Brown, J. M. (1979). "Evidence for acutely hypoxic cells in mouse tumours, and a possible mechanism of reoxygenation." Br J Radiol **52**(620): 650-6.
- Brown, J. M. (1999). "The hypoxic cell: a target for selective cancer therapy--eighteenth Bruce F. Cain Memorial Award lecture." Cancer Res **59**(23): 5863-70.
- Chabner, B. A. and T. G. Roberts, Jr. (2005). "Timeline: Chemotherapy and the war on cancer." Nat Rev Cancer **5**(1): 65-72.
- Chang, H. Y. and X. Yang (2000). "Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases." Microbiol Mol Biol Rev **64**(4): 821-46.
- Clifford, B., M. Beljin, et al. (2003). "G2 arrest in response to topoisomerase II inhibitors: the role of p53." Cancer Res **63**(14): 4074-81.
- Clottes, E. (2005). "[Hypoxia-inducible factor 1: regulation, involvement in carcinogenesis and target for anticancer therapy]." Bull Cancer **92**(2): 119-27.
- Comerford, K. M., T. J. Wallace, et al. (2002). "Hypoxia-inducible factor-1-dependent regulation of the multidrug resistance (MDR1) gene." Cancer Res **62**(12): 3387-94.
- Cory, S. and J. M. Adams (2002). "The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch." Nat Rev Cancer **2**(9): 647-56.
- Cory, S., D. C. Huang, et al. (2003). "The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis." Oncogene **22**(53): 8590-607.
- Danial, N. N. and S. J. Korsmeyer (2004). Cell death: critical control points. Cell. **116**: 205-19.
- Denko, N. C., L. A. Fontana, et al. (2003). "Investigating hypoxic tumor physiology through gene expression patterns." Oncogene **22**(37): 5907-14.
- Donovan, E. A. and S. Kummar (2006). "Targeting VEGF in cancer therapy." Curr Probl Cancer **30**(1): 7-32.
- Faucher, K., H. Rabinovitch-Chable, et al. (2003). "Overexpression of cytosolic glutathione peroxidase (GPX1) delays endothelial cell growth and increases resistance to toxic challenges." Biochimie **85**(6): 611-7.
- Fels, D. R. and C. Koumenis (2005). "HIF-1 α and p53: the ODD couple?" Trends Biochem Sci **30**(8): 426-9.
- Fridman, J. S. and S. W. Lowe (2003). "Control of apoptosis by p53." Oncogene **22**(56): 9030-40.
- Gartel, A. L. and A. L. Tyner (2002). "The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis." Mol Cancer Ther **1**(8): 639-49.
- Gothié, E. and J. Pouyssegur (2002). "HIF-1: Régulateur central de l'hypoxie." Medecine Sciences **18**: 70-78.

- Harris, S. L. and A. J. Levine (2005). "The p53 pathway: positive and negative feedback loops." Oncogene **24**(17): 2899-908.
- Helewski, K. J., G. I. Kowalczyk-Ziomek, et al. (2006). "[Apoptosis and necrosis--two different ways leading to the same target]." Wiad Lek **59**(9-10): 679-84.
- Horn, H. F. and K. H. Vousden (2007). "Coping with stress: multiple ways to activate p53." Oncogene **26**(9): 1306-16.
- Hubert, A., S. Paris, et al. (2006). "Casein kinase 2 inhibition decreases hypoxia-inducible factor-1 activity under hypoxia through elevated p53 protein level." J Cell Sci **119**(Pt 16): 3351-62.
- Igney, F. H. and P. H. Krammer (2002). "Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis." Nat Rev Cancer **2**(4): 277-88.
- Jaakkola, P., D. R. Mole, et al. (2001). "Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O2-regulated prolyl hydroxylation." Science **292**(5516): 468-72.
- Meek, D. W. (2004). "The p53 response to DNA damage." DNA Repair (Amst) **3**(8-9): 1049-56.
- Michiels, C. (2004). "Physiological and pathological responses to hypoxia." Am J Pathol **164**(6): 1875-82.
- Moll, U. M., S. Wolff, et al. (2005). "Transcription-independent pro-apoptotic functions of p53." Curr Opin Cell Biol **17**(6): 631-6.
- Nagata, S. (1994). "Apoptosis regulated by a death factor and its receptor: Fas ligand and Fas." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **345**(1313): 281-7.
- Olson, M. and S. Kornbluth (2001). "Mitochondria in apoptosis and human disease." Curr Mol Med **1**(1): 91-122.
- Papandreou, I., A. Powell, et al. (2005). "Cellular reaction to hypoxia: sensing and responding to an adverse environment." Mutat Res **569**(1-2): 87-100.
- Piret, J. P., E. Minet, et al. (2005). "Hypoxia-inducible factor-1-dependent overexpression of myeloid cell factor-1 protects hypoxic cells against tert-butyl hydroperoxide-induced apoptosis." J Biol Chem **280**(10): 9336-44.
- Piret, J. P., E. Minet, et al. (2005). "Hypoxia-inducible factor-1-dependent overexpression of myeloid cell factor-1 protects hypoxic cells against tert-butyl hydroperoxide-induced apoptosis." J Biol Chem **280**(10): 9336-44.
- Riedl, S. J. and Y. Shi (2004). "Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(11): 897-907.
- Seiwert, T. Y., J. K. Salama, et al. (2007). "The concurrent chemoradiation paradigm--general principles." Nat Clin Pract Oncol **4**(2): 86-100.
- Sermeus, A. (2007). "Hypoxia induces protection against etoposide-induced apoptosis: molecular profiling of changes in gene expression and transcription factor activity." soumis.
- Song, X., X. Liu, et al. (2006). "Hypoxia-induced resistance to cisplatin and doxorubicin in non-small cell lung cancer is inhibited by silencing of HIF-1alpha gene." Cancer Chemother Pharmacol **58**(6): 776-84.
- van Loo, G., X. Saelens, et al. (2002). "The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet." Cell Death Differ **9**(10): 1031-42.
- Vieira, H. L., D. Haouzi, et al. (2000). "Permeabilization of the mitochondrial inner membrane during apoptosis: impact of the adenine nucleotide translocator." Cell Death Differ **7**(12): 1146-54.
- Vogelstein, B. and K. W. Kinzler (2004). "Cancer genes and the pathways they control." Nat Med **10**(8): 789-99.

- Vousden, K. H. and X. Lu (2002). "Live or let die: the cell's response to p53." Nat Rev Cancer **2**(8): 594-604.
- Yu, Q. (2006). "Restoring p53-mediated apoptosis in cancer cells: new opportunities for cancer therapy." Drug Resist Updat **9**(1-2): 19-25.
- Zhou, J., T. Schmid, et al. (2006). " Tumor hypoxia and cancer progression." Cancer Lett **237**(1): 10-21.
- Zimmermann, K. C., C. Bonzon, et al. (2001). "The machinery of programmed cell death." Pharmacol Ther **92**(1): 57-70.

Bibliographie

Annexe 1 : Liste des gènes détectés par les microdamiers « Human Apoptosis »

Gene Symbol	Gene Name	Official Gene Symbol	General Function	Specific Function
ABL1	v-abl Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1	ABL1	Cell cycle	ATP binding; kinase activity
ADAM 17	a disintegrin and metalloproteinase domain 17 (tumor necrosis factor, alpha, converting enzyme)	ADAM 17	Cell migration	Metalloendopeptidase activity
AKT1	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1	AKT1	Apoptosis	Receptor signaling protein serine/threonine kinase activity
AKT2	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 2	AKT2	Apoptosis	Protein amino acid phosphorylation
BAD	BCL2-antagonist of cell death	BAD	Apoptosis	Pro-apoptotic; BCL2 binding protein
BAG	BCL2-associated athanogene	BAG1	Apoptosis	Interacts with Bcl2
BAK 1	BCL2-antagonist/killer 1	BAK 1	Apoptosis	Accelerates programmed cell death by binding to BCL-2
bax	BCL2-associated X protein	BAX	Apoptosis	Induces the release of cyt C, activation of caspase-3
BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2	BCL2	Apoptosis	Regulates the death cell
BCL2A1	BCL2-related protein A1	BCL2A1	Apoptosis	Apoptosis regulator activity
BclX	BCLX protein	BclX	Apoptosis	Induces or Inhibits apoptosis according to the alternative form
BID	BH3 interacting domain death agonist	BID	Apoptosis	Apoptotic mitochondrial changes; Death receptor ligand
23kd	23KDa Highly basic protein	RPL13A	HouseKeeping gene	HouseKeeping gene
BIK	BCL2-interacting killer (apoptosis-inducing)	BIK	Apoptosis	Apoptosis regulator activity
BIRC2	baculoviral IAP repeat-containing 2	BIRC2	Apoptosis	Positive regulation of I-kappaB kinase/NF-kappaB cascade
Aldo	Aldolase A,	ALDOA	HouseKeeping gene	HouseKeeping gene
BIRC3	baculoviral IAP repeat-containing 3	BIRC3	Apoptosis	Interacts with TNF receptor associated factors 1 and 2 (TRAF1 and TRAF2)
BIRC4	baculoviral IAP repeat-containing 4	BIRC4	Apoptosis	Inhibitor of caspase-3, -7 and -9.
BIRC5	baculoviral IAP repeat-containing 5 (survivin)	BIRC5	Apoptosis	Cysteine protease inhibitor activity
BNIP3	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3	BNIP3	Apoptosis	Binds to the adenovirus E1B 19 kDa protein or to BCL-2
CASP1	caspase 1, apoptosis-related cysteine protease (interleukin 1, beta, convertase)	CASP1	Apoptosis	Caspase activity
CASP2	caspase 2, apoptosis-related cysteine protease (neural precursor cell expressed)	CASP2	Apoptosis	Activated in cytotoxic stress, required for the permeabilization of mitochondria, required for stress-induced apoptosis
CASP3	caspase 3, apoptosis-related cysteine protease	CASP3	Apoptosis	Initiation of apoptotic cell death; PARP cleavage protease
CASP4	caspase 4, apoptosis-related cysteine protease	CASP4	Protein binding	Involved in the activation cascade of caspases responsible for apoptosis execution
CASP8	caspase 8, apoptosis-related cysteine protease	CASP8	Apoptosis	Thiol protease; PARP cleavage protease=signature apoptotic fragments
cnd1	cyclinD1	CCND1	Cell cycle	Regulatory subunit of CDK4 or CDK6
cnd2	cyclinD2	CCND2	Cell cycle	Regulatory subunit of CDK4 or CDK7
Tubu	Alpha-tubulin	K-ALPHA-1	HouseKeeping gene	HouseKeeping gene
CCNH	cyclin H	CCNH	Cell cycle	Phosphorylates and activates cyclin-dependant protein kinases in the regulation of cell cycle progression

CDC2	cell division cycle 2, G1 to S and G2 to M	CDC2	Cell cycle	Cyclin-dependent protein kinase activity
CDC25C	cell division cycle 25C	CDC25C	Cell cycle	Dephosphorylates CDC2 and
CDC6	CDC6 cell division cycle 6 homolog (S. cerevisiae)	CDC6	Cell cycle	Negative regulation of DNA replication
CDK2	cyclin-dependent kinase 2	CDK2	Cell cycle	Cyclin-dependent protein kinase activity
CMM3	cyclin-dependent kinase 4	CDK4	Cell cycle	The activity of this kinase is restricted to the G1-S phase; cell proliferation
CDK5	cyclin-dependent kinase 5	CDK5	Cell cycle	Interacts with p35 which
p35	cyclin-dependent kinase 5, regulatory subunit 1 (p35)	CDK5R1	Cell cycle	Activates the kinase
cdk6	cyclin-dependent kinase 6	CDK6	Cell cycle	Interacts with D-type cyclins and phosphorylate pRB in G1-phase
ACTB	Beta-Actin	ACTB	HouseKeeping gene	HouseKeeping gene
cdk7	cyclin-dependent kinase 7 (MO15 homolog, Xenopus laevis, cdk-activating kinase)	CDK7	Cell cycle	Regulation of cyclin dependent protein kinase activity
cdk9	cyclin-dependent kinase 9 (CDC2-related kinase)	CDK9	Cell proliferation	Regulation of cell cycle
p21	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)	CDKN1A	Cell cycle	Inhibitor 1A of G1-specific CDK-cyclin complexes
p57	cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p57, Kip2)	CDKN1C	Cell cycle	Inhibits G1-specific CDK-cyclin complexes,negative regulator of cell proliferation.
p16	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (melanoma, p16, inhibits CDK4)	CDKN2A	Cell cycle	Inhibitor of G1-specific CDK-cyclin complexes 2A, tumor suppressor gene
p14-15	cyclin-dependent kinase inhibitor 2B (p15, inhibits CDK4)	CDKN2B	Cell cycle	Cyclin-dependent protein kinase inhibitor activity
CFLAR	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator	CFLAR	Apoptosis	Caspase activity
CLK1	CDC-like kinase 1	CLK1	Cell cycle	Protein serine/threonine kinase activity
APOJ	ApolipoproteinJ	CLU	Lipid metabolism	Activate its kinase activity
CRADD	CASP2 and RIPK1 domain containing adaptor with death domain	CRADD	Apoptosis	Apoptosis regulator activity
CSE1L	CSE1 chromosome segregation 1-like (yeast)	CSE1L	Cell proliferation	Intracellular protein transport
cyc	Cyclophilin 33A	PPIE	HouseKeeping gene	HouseKeeping gene
REDD2	DDIT4L: DNA-damage-inducible transcript 4-like	DDIT4L	/	/
DFFA	DNA fragmentation factor, 45kDa, alpha polypeptide	DFFA	Apoptosis	DNA fragmentation
E2F1	E2F transcription factor 1	E2F1	Transcription	Tumor suppressor, Transcription factor
GAPD	Glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase	GAPD	HouseKeeping gene	HouseKeeping gene
E2F3	E2F transcription factor 3	E2F3	Transcription	Transcription factor; binds Rb protein
E2F5	E2F transcription factor 5, p130-binding	E2F5	Transcription	Transcription factor, DNA binding
FADD	Fas (TNFRSF6)-associated via death domain	FADD	Apoptosis	Active caspase-8 initiates the subsequent cascades of caspase mediating apoptosis
GADD45A	growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha	GADD45A	Stress response	Glutathione transferase activity
GAS1	growth arrest-specific 1	GAS1	DNA repair	Structural constituent of ribosome
GPX	glutathione peroxidase 1	GPX1	Oxidative metabolism	Protects the hemoglobin in erythrocytes from oxidative breakdown
GRB2	growth factor receptor-bound protein 2	GRB2	Cell cycle	Cell structure

GSA	glutathione S-transferase A1	GSA	Drug metabolism	Glutathion (phase II)
GSM	glutathione S-transferase M1	GSM	Drug metabolism	Glutathion (phase II)
GSR	glutathione reductase	GSR	Drug metabolism	Glutathion : Maintain high levels of reduced glutathione (phase II)
GSTPi	Glutathione S-transferase pi	GSTP1	Drug metabolism	Glutathion (phase II)
GSTT1	Glutathione S-transferase theta1	GSTT1	Drug metabolism	Glutathion (phase II)
IGF1	insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)	IGF1	Growth factor and cytokines	Muscle/skeletal development; Growth factor
IGF1R	insulin-like growth factor 1 receptor	IGF1R	Cell signaling / receptor	Anti-apoptotic; receptor
IGF2	insulin-like growth factor 2 (somatomedin A)	IGF2	Skeletal development	Regulation of cell cycle; potent mitogens for cultured cells
IGF2R	insulin-like growth factor 2 receptor	IGF2R	Receptor	Binds insulin growth factor II
IGF2	insulin-like growth factor binding protein 2, 36kDa	IGFBP2	Growth factor and cytokines	Growth factor modulation
HK1	Hexokinase 1	HK1	HouseKeeping gene	HouseKeeping gene
IGFBP3	insulin-like growth factor binding protein 3	IGFBP3	Growth factor and cytokines	Growth factor modulation
IGFBP4	insulin-like growth factor binding protein 4	IGFBP4	Cell proliferation	Regulation of cell growth
HPRT	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	HPRT1	HouseKeeping gene	HouseKeeping gene
IGFBP5	insulin-like growth factor binding protein 5	IGFBP5	Growth factor and cytokines	Growth factor modulation
IGFBP6	insulin-like growth factor binding protein 6	IGFBP6	Signal transduction	Signal transduction
ING1	inhibitor of growth family, member 1	ING	Cell proliferation	Tumor suppressor; potent growth regulator in normal and in established cells
JUN	v-jun sarcoma virus 17 oncogene homolog (avian)	JUN	MAPK signaling pathway	RNA polymerase II transcription factor activity
TNFB	lymphotoxin alpha (TNF superfamily, member 1)	LTA	Growth factor and cytokines	induction of apoptosis
LTB	lymphotoxin beta (TNF superfamily, member 3)	LTB	Growth factor and cytokines	Role in immune response
MEK1	mitogen-activated protein kinase kinase 1	MAP2K1	Cell cycle	Kinase; Catalyzes the phosphorylation of a thr and a tyr in a thr-glu-tyr
MAP2K5	mitogen-activated protein kinase kinase 5	MAP2K5	Stress response	Protein serine/threonine kinase activity
MAP2K6	mitogen-activated protein kinase kinase 6	MAP2K6	Stress response	Protein serine/threonine kinase activity
MAP3K14	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 14	MAP3K14	Stress response	Protein serine/threonine kinase activity
erk2	mitogen-activated protein kinase 1	MAPK1	Apoptosis	Transferase activity
JNK3	mitogen-activated protein kinase 10	MAPK10	Stress response	Kinase
MAPK12	mitogen-activated protein kinase 12	MAPK12	Stress response	Protein serine/threonine kinase activity
MAPK14	mitogen-activated protein kinase 14	MAPK14	Stress response	Protein serine/threonine kinase activity
MDH	Malate dehydrogenase 1	MDH1	HouseKeeping gene	HouseKeeping gene
erk1	mitogen-activated protein kinase 3	MAPK3	Stress response	Protein serine/threonine kinase activity

erk5	mitogen-activated protein kinase 7	MAPK7	Cell adhesion	Protein-tyrosine kinase activity
JNK1	mitogen-activated protein kinase 8	MAPK8	Stress response	Regulates c-jun, Kinase
JNK2	mitogen-activated protein kinase 9	MAPK9	Stress response	Regulates c-jun, Kinase
PLA2	Phospholipase A2	YWHAZ	HouseKeeping gene	HouseKeeping gene
MCL1	myeloid cell leukemia sequence 1 (BCL2-related)	MCL1	Apoptosis	Apoptosis regulator activity
MDM2	Mdm2, transformed 3T3 cell double minute 2, p53 binding protein (mouse)	MDM2	Oncogenesis	Transcription factor
MGST1	microsomal glutathione S-transferase 1	MGST1	Glutathione metabolism	Transferase activity
MYCN	v-myc myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived (avian)	MYCN	Transcription factor	Transcription factor activity
NFATC1	nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 1	NFATC1	Wnt signaling pathway	Regulate the activation, proliferation, differentiation and programmed death of T-lymphocytes
NFKB	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1 (p105)	NFKB1	Transcription	Inflammatory response; antibacterial humoral response
NOS2A	nitric oxide synthase 2A (inducible, hepatocytes)	NOS2A	Electron transport	Nitric-oxide synthase activity
PCNA	proliferating cell nuclear antigen	PCNA	Cell cycle	Increasing the polymerase's processibility
PDE1B	phosphodiesterase 1B, calmodulin-dependent	PDE1B	Apoptosis	Calmodulin-dependent cyclic-nucleotide phosphodiesterase activity
S9	Ribosomal Proteine S9	RPS9	HouseKeeping gene	HouseKeeping gene
PLD1	phospholipase D1, phophatidylcholine-specific	PLD1	Phospholipid metabolism	Phospholipase D activity
PLK	polo-like kinase (Drosophila)	PLK	DNA repair / synthesis	Mitosis, kinase
POR	P450 (cytochrome) oxidoreductase	POR	Electron transport	Oxidoreductase activity
RAF1	v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1	RAF1	Oncogenesis	Apoptosis regulation, Kinase
RARB	retinoic acid receptor, beta	RARB	Receptor activity	Receptor of retinoic acid
RB1	retinoblastoma 1 (including osteosarcoma)	RB1	Cell cycle	Interacts with histone deacetylase to repress transcription; tumor repressor
RB2	retinoblastoma-like 2 (p130)	RBL2	Cell cycle	Negative regulation of cell cycle
RBP1	retinoblastoma binding protein 1	RBP1	DNA binding / cell cycle	Chromatin binding
RIPK1	receptor (TNFRSF)-interacting serine-threonine kinase 1	RIPK1	Stress response	Protein serine/threonine kinase activity
TANK	TRAF family member-associated NFKB activator	TANK	Signal transduction	Protein binding
DP1	transcription factor Dp-1	TFDP1	Transcription	Mediator of transcriptional activation by TGF-beta receptor;involved in the cell cycle ; Pol II transcription
DP2	transcription factor Dp-2 (E2F dimerization partner 2)	TFDP2	Transcription	Transcription factor ; Pol II transcription
SDS	Serine Dehydratase	SDS	HouseKeeping gene	HouseKeeping gene
TNFa	tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)	TNF	Apoptosis	Endotoxin; pathophysiology of sepsis
TNFRSF10A	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10a	TNFRSF10A	Apoptosis	Activation of NF-kappaB-inducing kinase
TNFRSF10B	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b	TNFRSF10B	Apoptosis	Activation of NF-kappaB-inducing kinase
TNFRSF1A	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A	TNFRSF1A	Growth factor and	Receptor activity

			cytokine	
TNFRSF1B	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1B	TNFRSF1B	Cell signaling / receptor	Receptor
TNFRSF6	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 6	TNFRSF6	Growth factor and cytokine	Transmembrane receptor activity
TNFSF10	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	TNFSF10	Apoptosis	Tumor necrosis factor receptor binding
TNFSF5	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 5 (hyper-IgM syndrome)	TNFSF5	Growth factor and cytokine	Tumor necrosis factor receptor binding
TNFSF6	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 6	TNFSF6	Growth factor and cytokine	Tumor necrosis factor receptor binding
TFR	Transferrin receptor	TFRC	HouseKeeping gene	HouseKeeping gene
TNFSF7	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 7	TNFSF7	Apoptosis	Tumor necrosis factor receptor binding
p53	tumor protein p53 (Li-Fraumeni syndrome)	TP53	Cell cycle	DNA-binding protein; tumor suppressor activity
TP73	tumor protein p73	TP73	Transcription factor	Transcription factor activity
TRADD	TNFRSF1A-associated via death domain	TRADD	Apoptosis	induction of apoptosis
TRAF2	TNF receptor-associated factor 2	TRAF2	Signal transduction	Signal transducer activity
TRAF3	TNF receptor-associated factor 3	TRAF3	Apoptosis	Role in immune response
TRAF5	TNF receptor-associated factor 5	TRAF5	Apoptosis	Signal transducer activity
TRAF6	TNF receptor-associated factor 6	TRAF6	MAPK signaling pathway	Mediates activation of NF-kappa-B and JNK

Annexe 2 : Résultats complets des microdamiers

	CTL + étóp	siRNA p53 + étóp	siRNA NT +étóp	CTL	siRNA p53	siRNA NT
CDKN1A	5,42	0,51	3,52	1,00	0,21	1,59
GADD45A	1,06	0,23	1,01	1,00	0,35	1,09
BAX	2,07	0,58	2,03	1,00	0,65	0,64
GPX1	2,08	0,62	1,54	1,00	0,73	1,04
TNFRSF10B	1,23	0,39	1,58	1,00	0,40	0,60
BclX	1,99	0,82	1,99	1,00	1,59	0,65
PCNA	2,20	0,92	1,86	1,00	0,56	1,11
BAK 1	1,46	0,62	1,93	1,00	0,76	1,29
GSTT1	1,20	0,60	0,94	1,00	0,80	0,83
TP73	1,53	0,77	1,24	1,00	0,95	0,77
CDK4	0,54	1,13	0,31	1,00	0,86	0,93
CDK2	0,79	1,85	0,17	1,00	0,86	1,11
TNFRSF6	2,93	0,01	1,11	1,00	0,02	1,42
TP53	1,35	0,13	0,32	1,00	0,00	0,66
IGFBP4	1,22	0,16	0,09	1,00	0,15	0,14
MDM2	1,64	0,24	1,24	1,00	0,05	0,41
JUN	0,77	0,19	0,16	1,00	0,57	0,66
NFATC1	1,61	0,48	0,22	1,00	0,56	0,80
TRADD	0,54	0,17	0,24	1,00	0,36	0,52
TRAF3	1,03	0,32	0,24	1,00	0,56	0,80
LTB	0,87	0,30	0,97	1,00	0,42	0,58
AKT2	1,13	0,43	0,59	1,00	0,97	0,96
TNFRSF1B	1,04	0,42	0,28	1,00	0,21	0,55
BAG1	0,71	0,30	0,22	1,00	0,60	1,32
CLK1	0,99	0,43	0,31	1,00	0,28	1,17
RB1	1,31	0,68	1,59	1,00	0,66	1,09
CDC25C	0,48	0,91	0,10	1,00	0,60	1,45
CDK5	1,50	3,35	0,26	1,00	0,88	0,84
BIRC4	0,25	0,60	0,17	1,00	0,13	0,99
GSA	0,25	0,68	1,26	1,00	0,66	2,14
CASP3	0,33	1,20	0,49	1,00	0,59	1,36
CASP2	0,25	0,98	0,16	1,00	0,67	0,54
CDC6	0,22	1,04	0,12	1,00	0,54	0,82
BIRC2	0,27	1,83	0,09	1,00	1,74	1,93
SDS	1,61	0,41	0,01	1,00	0,30	0,80

PPIE	1,03	0,54	0,12	1,00	0,39	0,64
CSE1L	2,93	2,99	1,36	1,00	1,84	0,69
PLK	0,67	0,71	0,38	1,00	1,61	0,37
CLU	1,39	1,63	0,80	1,00	1,22	0,89
RBP1	1,27	0,71	0,74	1,00	0,84	0,94
MGST1	0,36	0,57	0,63	1,00	0,70	1,27
IGFBP5	0,78	0,69	0,02	1,00	0,59	0,57
CDK9	1,03	0,89	0,16	1,00	0,55	0,65
CCND2	0,96	1,49	0,23	1,00	1,07	1,83
MAPK3	1,77	1,54	0,45	1,00	1,55	1,27
CASP4	0,77	0,71	0,21	1,00	0,45	1,09
CDC2	1,50	2,22	0,42	1,00	0,67	1,52
BIRC5	0,53	0,70	0,15	1,00	0,99	0,97
PLD1	0,51	0,53	0,14	1,00	0,53	0,44
TNFSF7	1,10	0,84	0,41	1,00	0,87	0,85
ADAM 17	0,59	0,74	0,23	1,00	0,31	2,09
BNIP3	0,71	0,53	0,29	1,00	0,44	1,13
CDKN1C	0,51	0,59	0,23	1,00	0,43	0,46
MAPK9	0,66	0,60	0,32	1,00	0,54	1,00
HK1	1,19	0,81	0,14	1,00	1,12	0,82
K-ALPHA-1	0,82	1,44	0,47	1,00	1,02	1,15
MAPK7	2,17	1,75	2,61	1,00	1,97	1,67
MAP2K1	0,52	0,48	0,56	1,00	0,61	0,20
GSR	0,37	0,48	0,40	1,00	0,64	1,13
IGF2	2,15	1,45	2,05	1,00	1,42	1,06
IGF2R	1,99	1,75	2,60	1,00	1,96	0,90
IGFBP2	1,95	1,49	2,31	1,00	1,54	0,76
GRB2	1,87	1,64	1,97	1,00	1,69	3,55
MAP2K5	0,55	0,29	0,27	1,00	0,33	0,56
MAPK8	0,49	0,39	0,34	1,00	0,47	1,19
RIPK1	0,47	0,44	0,49	1,00	0,43	1,04
CRADD	0,44	0,69	0,22	1,00	0,63	0,92
CDK5R1	0,39	0,44	0,22	1,00	0,28	0,73
RBL2	0,38	0,35	0,37	1,00	0,32	0,90
MAPK12	0,36	0,14	0,13	1,00	0,76	0,41
CFLAR	0,36	0,32	0,19	1,00	0,31	0,85
TFDP2	0,30	0,07	0,20	1,00	0,10	1,23
TRAF6	0,30	0,63	0,19	1,00	0,23	0,97
LTA	0,28	0,25	0,16	1,00	0,21	0,41

GSTP1	0,25	2,11	0,01	1,00	3,04	2,73
E2F5	0,23	0,61	0,07	1,00	1,00	1,14
ING	0,01	0,15	0,07	1,00	0,20	0,99
ACTB	3,25	3,36	2,59	1,00	2,19	0,98
HPRT1	0,09	0,13	0,04	1,00	0,31	0,86
CASP8	1,00	0,89	0,77	1,00	0,36	0,54
CDKN2B	1,29	1,06	0,88	1,00	0,51	0,82
TNFRSF10A	1,25	0,73	1,14	1,00	0,50	0,36
CCND1	1,44	1,25	0,97	1,00	0,62	0,89
CDK6	0,90	0,69	0,66	1,00	0,41	1,07
CDKN2A	1,55	1,33	1,08	1,00	0,80	0,88
CDK7	0,85	0,86	0,63	1,00	0,46	1,55
TANK	0,63	0,74	0,84	1,00	0,66	1,37
NFKB1	0,63	0,64	0,97	1,00	0,87	1,47
AKT1	0,98	1,04	1,10	1,00	1,03	0,42
CCNH	0,77	1,26	0,54	1,00	0,83	1,42
BCL2A1	0,65	0,40	0,85	1,00	0,36	3,17
E2F3	0,58	0,23	0,00	1,00	0,98	3,26
BIRC3	0,17	0,12	0,34	1,00	0,16	1,34
NOS2A	0,26	0,81	0,76	1,00	1,69	8,29
GAPD	1,67	1,23	1,76	1,00	1,55	0,72
TFRC	0,66	0,90	0,65	1,00	0,90	0,36
ABL1	0,64	0,71	0,83	1,00	0,98	0,94
BAD	0,93	1,02	1,08	1,00	1,03	0,90
BCL2	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
BID	0,68	0,50	0,54	1,00	0,61	0,88
BIK	1,31	0,95	1,07	1,00	1,14	0,92
CASP1	0,02	0,01	0,01	1,00	0,01	6,42
DDIT4L	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
DFFA	0,81	0,61	0,80	1,00	0,55	0,77
E2F1	0,80	0,91	0,81	1,00	0,97	0,94
FADD	0,59	0,52	0,55	1,00	0,81	1,02
GAS1	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
GSM	0,82	0,77	0,93	1,00	0,91	0,92
IGF1	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
IGF1R	1,09	0,72	1,62	1,00	1,02	0,90
IGFBP3	0,91	0,50	2,24	1,00	0,30	1,60
IGFBP6	0,74	0,50	0,50	1,00	0,52	0,67
MAP2K6	0,11	0,07	0,07	1,00	0,07	0,14

MAP3K14	0,30	0,25	0,00	1,00	0,30	0,27
MAPK1	0,64	0,54	0,84	1,00	0,69	0,99
MAPK10	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
MAPK14	0,65	0,60	0,27	1,00	0,64	0,76
MCL1	0,58	0,34	0,83	1,00	0,34	0,65
MYCN	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
PDE1B	0,94	0,23	0,08	1,00	0,31	0,67
POR	0,86	0,80	0,87	1,00	1,28	1,02
RAF1	0,79	0,89	0,93	1,00	0,96	1,06
RARB	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
TFDP1	0,69	0,66	0,70	1,00	0,66	1,18
TNF	1,05	0,70	0,70	1,00	0,70	0,85
TNFRSF1A	0,88	0,62	0,75	1,00	1,01	0,93
TNFSF10	0,06	0,07	1,36	1,00	0,00	0,28
TNFSF5	0,70	1,21	0,20	1,00	0,09	0,30
TNFSF6	0,40	0,34	0,20	1,00	0,08	0,81
TRAF2	0,99	0,90	0,92	1,00	0,94	0,93
TRAF5	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
RPL13A	1,54	1,04	1,44	1,00	1,20	0,87
ALDOA	1,09	0,92	1,32	1,00	1,23	0,83
MDH1	0,81	0,65	0,86	1,00	0,53	1,11
YWHAZ	0,56	0,65	0,85	1,00	0,80	0,98
RPS9	1,27	0,81	1,11	1,00	1,03	0,99

Première possibilité:

- 4211



atgttaggcaagctggctctgaactcctgacctgacctcaggtgatctgcctgcct

Deuxième possibilité:

- 3549



tcaagcaatcctcccacctcagccttccaaagtgtgggattaaggcgtgagccactgggcc

Figure 1: L'analyse par TransFac montre qu'il y a deux régions du promoteur de Bak qui pourraient permettre la liaison de p53. Les séquences rouges correspondent aux séquences consensus sur lesquelles peut venir se lier un monomère de p53. La flèche indique à quelle position se trouve la première base de la première séquence consensus par rapport à l'atg d'initiation de la transcription.

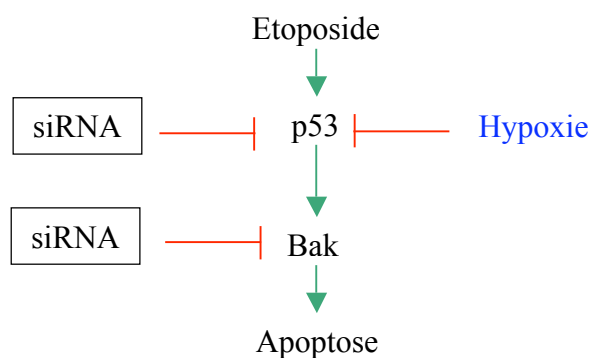


Figure 2 : Schéma récapitulatif des différents résultats obtenus. L'étoposide provoque l'apoptose via p53. Le siRNA anti-p53 inhibe l'expression de p53 mais aussi celle de Bak, tandis que le siRNA anti-Bak inhibe l'expression de Bak, ce qui résulte à une diminution de l'apoptose. Ces observations mises ensemble suggèrent que l'étoposide active p53, qui en réponse augmente l'expression de Bak. Bak étant un effecteur apoptotique, l'apoptose est donc augmentée. L'hypoxie diminuerait alors l'apoptose induite par l'étoposide en inhibant l'expression de p53 et par conséquent l'expression et l'activité de Bak.

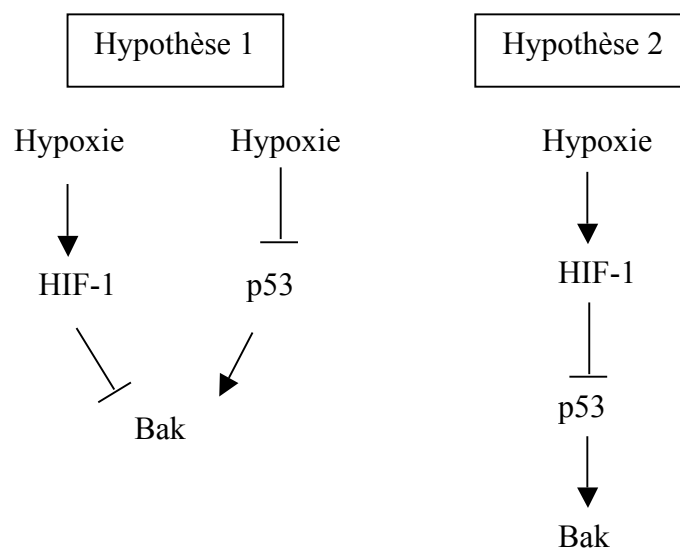


Figure 3 : Schéma reprenant les différentes hypothèses émises quant au lien entre les effets de p53 et de HIF-1 sur l'expression de Bak. L'hypothèse 1 suggère que l'hypoxie active HIF-1, qui inhibe alors l'expression de Bak. En parallèle, l'hypoxie inhibe p53, qui ne peut donc plus augmenter l'expression de Bak. Ces effets combinés résultent alors à une diminution de l'apoptose. L'hypothèse 2 suggère que p53 est inhibé par HIF-1, ce dernier étant activé en réponse à l'hypoxie. L'expression de Bak est donc diminuée et l'apoptose en résultant également.

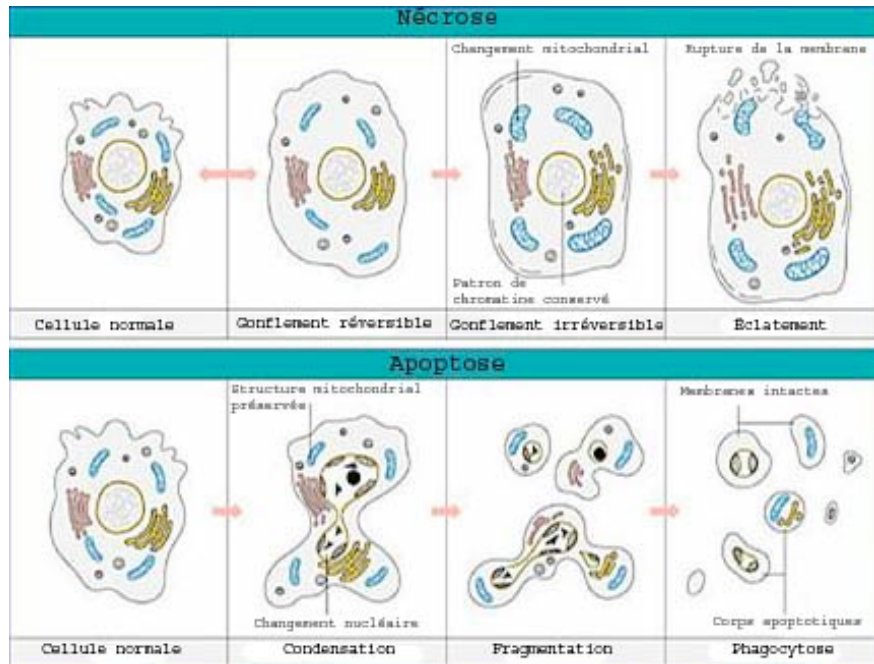


Figure 1 : Comparaison entre la nécrose et l'apoptose.

(www.theses.ulaval.ca/2005/23101/23101000.jpg)

La nécrose correspond à un éclatement de la cellule tandis que l'apoptose aboutit à la formation de corps apoptotiques qui seront phagocytés. Une des caractéristiques de l'apoptose est la fragmentation typique de l'ADN et une condensation de la cellule tandis que la cellule en nécrose a plutôt tendance à gonfler.

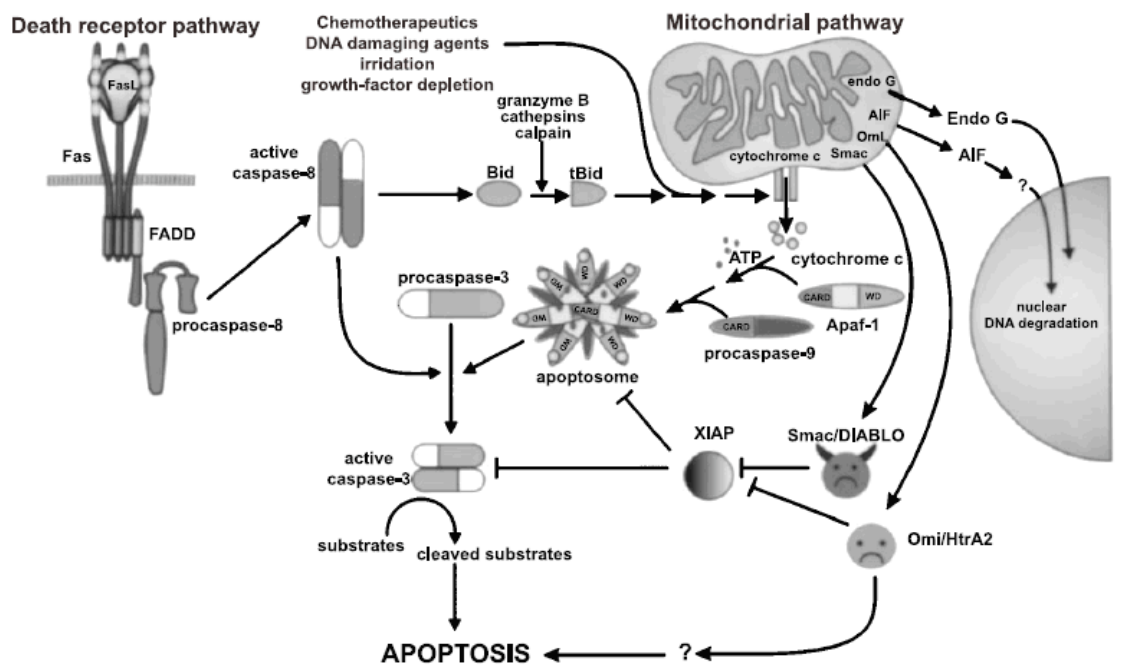


Figure 2 : Vue générale de l'apoptose (van Loo, Saelens et al. 2002)

Deux voies permettent d'initier l'apoptose, soit via un récepteur de mort, soit via un stimulus interne. L'intégration de l'apoptose passe par la perméabilisation de la mitochondrie qui libère certaines protéines essentielles à l'exécution de l'apoptose. Cette exécution va se faire via les caspases, qui vont cliver certains substrats, menant à la fragmentation de l'ADN et la formation de corps apoptotiques.

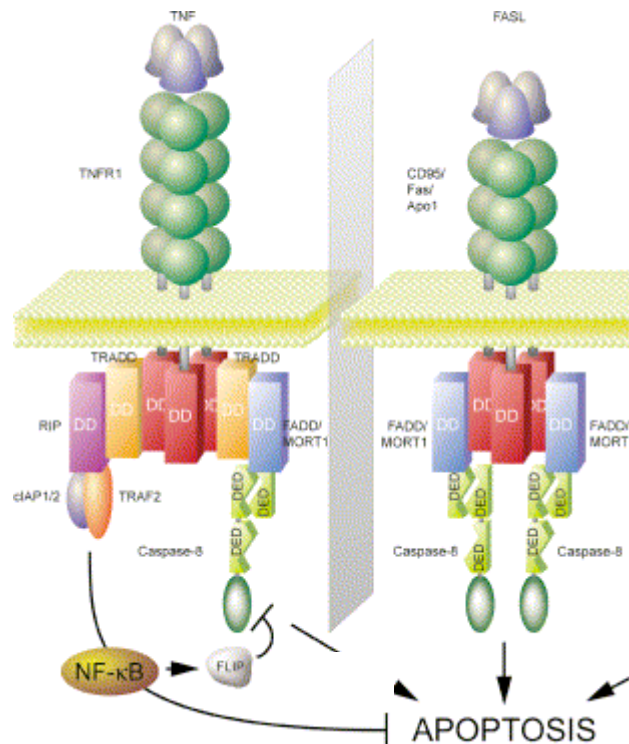


Figure 3 : Les différents récepteurs de mort (Danial and Korsmeyer 2004)

Le premier type de récepteur de mort est le récepteur au TNF. Sa liaison au TNF- α peut provoquer la formation de deux complexes : celui composé de TRAF2, cIAP et RIP1, tous recrutés par le domaine de mort TRADD, active la voie NF- κ B afin de favoriser la survie ; tandis que celui composé de FADD, aussi recruté par TRADD, permet l'activation de la procaspase 8 et donc l'apoptose. L'apoptose ne sera déclenchée que si l'activation de NF- κ B via le premier complexe est insuffisante.

Le deuxième type de récepteur de mort est le récepteur au FasL. Sa liaison engendre un changement conformationnel qui aboutit à la formation d'un complexe DISC, composé de FADD lié à Fas via son domaine de mort DD, tandis que le domaine effecteur de mort DED de FADD permet l'activation de la pro-caspase 8.

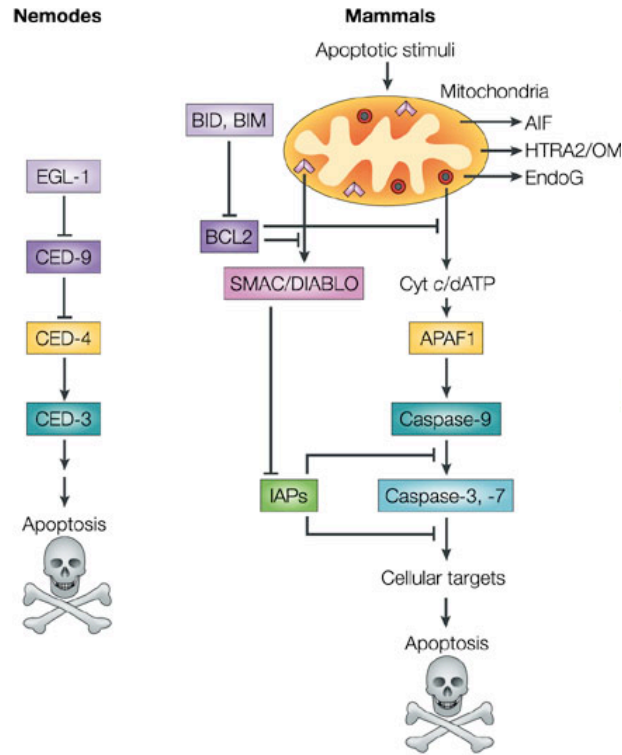


Figure 4 : Comparaison de l'apoptose entre les nématodes et les mammifères (Riedl and Shi 2004)

Plusieurs comparaisons peuvent être faites entre le nématode et l'homme. En effet, Ced-4 est l'homologue de Apaf-1, par exemple. Néanmoins, l'apoptose chez le nématode ne passe pas par la mitochondrie. Ces parallélismes ont permis de découvrir la fonction des protéines impliquées dans l'apoptose chez l'homme.

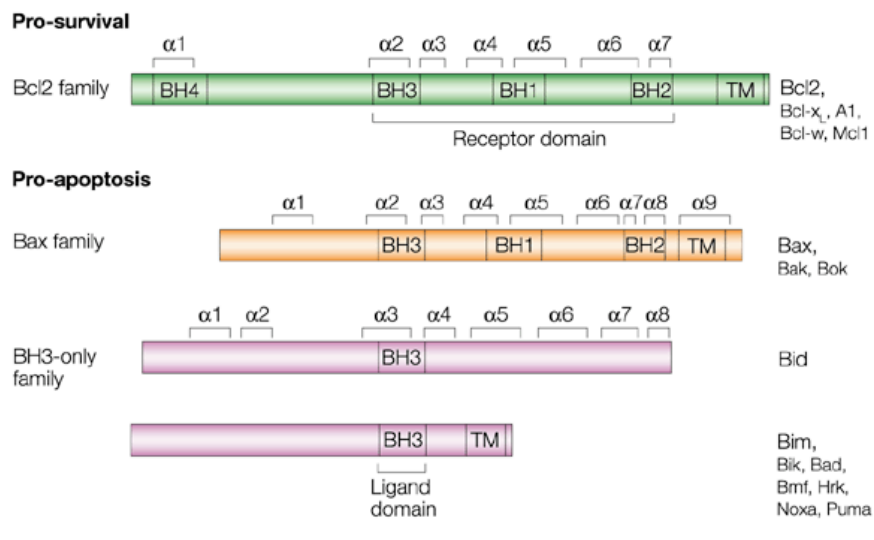


Figure 5 : Classification des protéines de la famille Bcl2 (Cory and Adams 2002)

Les protéines anti-apoptotiques ne contiennent qu'une seule classe : la famille Bcl-2 qui comporte les quatre domaines d'homologie. Les protéines pro-apoptotiques, quant à elles, contiennent deux sous-classes : la famille Bax et la famille BH₃-only. La famille Bax contient tous les domaines sauf le BH₄, tandis que la famille BH₃-only ne contient, comme son nom l'indique, que le domaine BH₃.

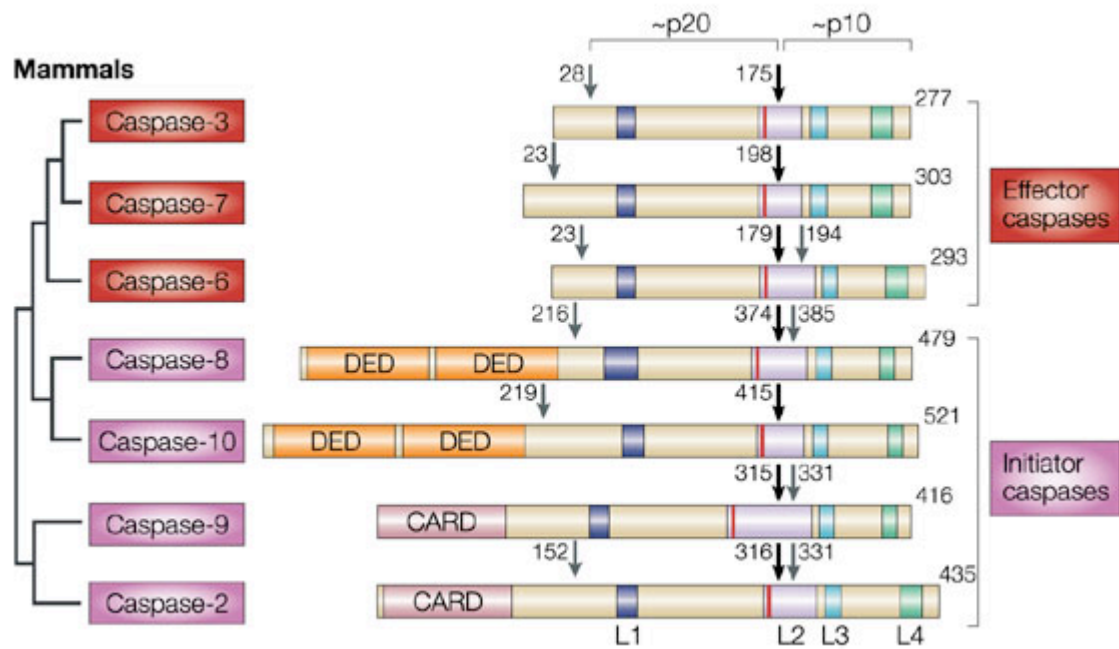


Figure 6 : Structure des différentes caspases impliquées dans l'apoptose (Riedl and Shi 2004)

Les quatre caspases initiateuses ont un pro-domaine plus long, contenant soit CARD ou DED. Cela leur permet de recevoir les signaux des effecteurs en amont. Les caspases effectrices, quant à elles, n'ont pas ce pro-domaine long. Toutes ces caspases ont une petite sous-unité de 10 kDa et une grande sous-unité de 20 kDa, ces deux sous-unités sont clivées afin de générer une caspase active.

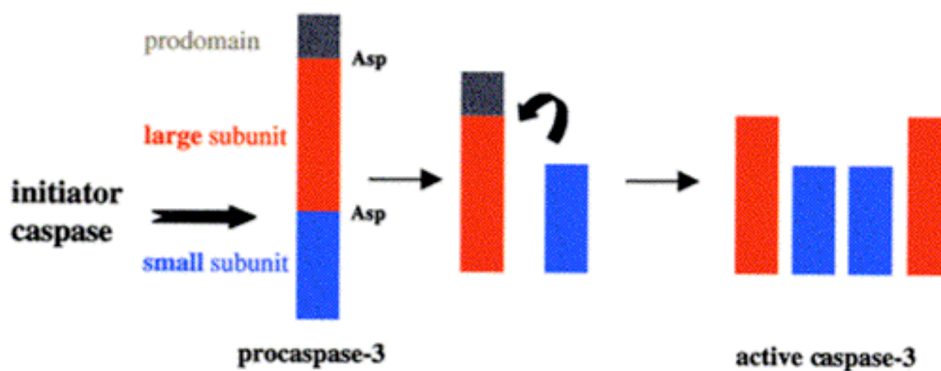


Figure 7 : Activation des caspases effectrices (Zimmermann, Bonzon et al. 2001)

Les caspases initiateuses ont la capacité de s'auto-cliver, par contre les caspases effectrices doivent être clivées par les initiateuses. Le clivage se fait après le résidu aspartate qui se trouve entre la grande (20 kDa) et la petite sous-unité (10 kDa). Le pro-domaine est plus long pour les caspases initiateuses afin de leur permettre de recevoir les signaux.

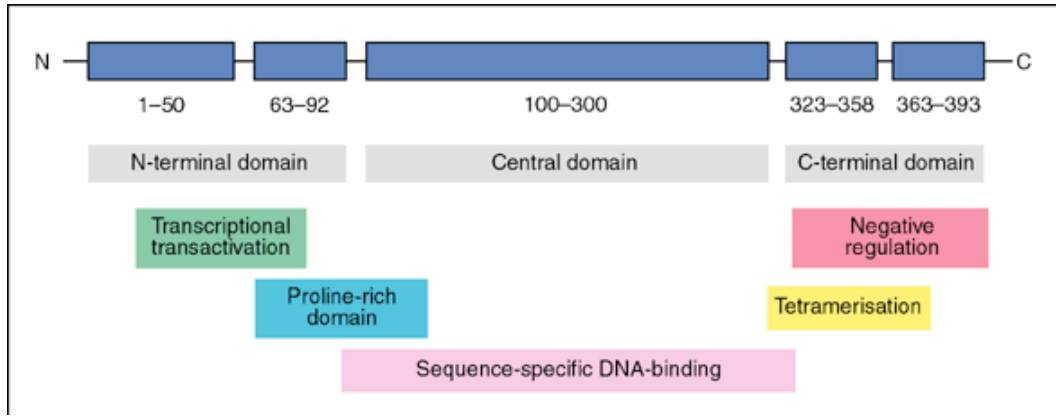


Figure 8 : Structure de la protéine p53 (www-ermm.cbcu.cam.ac.uk/0300694Xh.htm.)

La protéine p53 est composée de trois régions principales : un domaine de transactivation N-terminal, un domaine d'oligomérisation C-terminal et un domaine de liaison à l'ADN. Les domaines C et N-terminaux sont aussi présents dans les protéines p63 et p73.

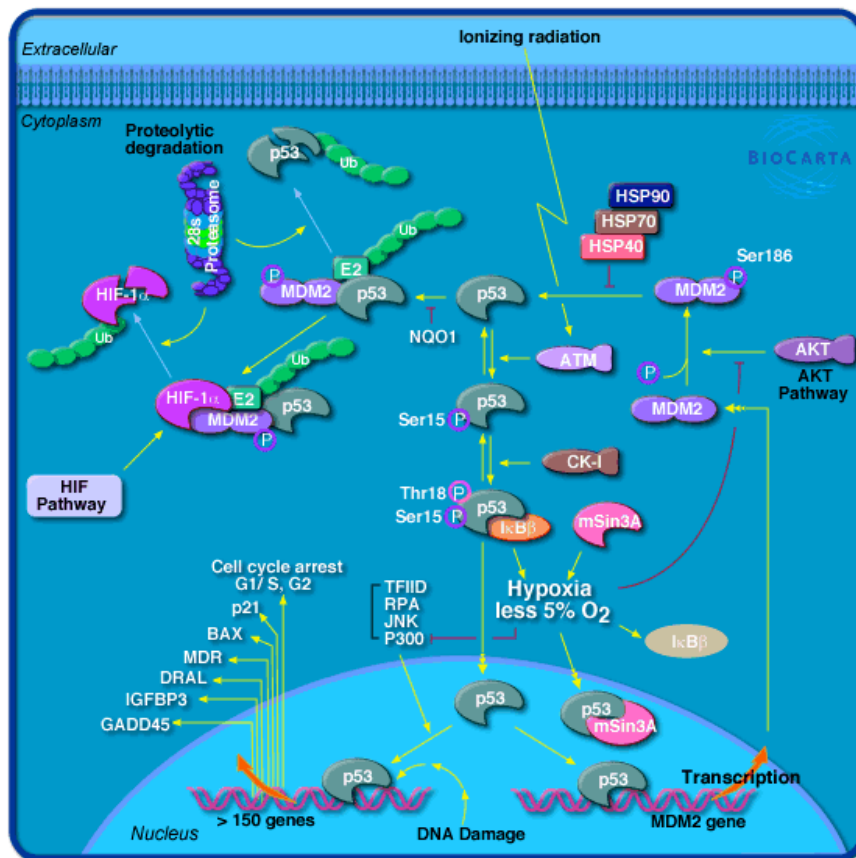


Figure 9 : Schéma de la régulation de p53 (biocarta)

Dans des conditions normales, p53 est dégradé par le protéasome grâce à son inhibiteur, MDM2. Celui-ci, fonctionnant comme une E3-ubiquitine ligase, ubiquitinye p53, ce qui provoque sa dégradation. En réponse à divers stimuli, comme des dommages à l'ADN, p53 est phosphorylé par les protéines kinases ATM ou ATR, ce qui empêche la liaison de MDM2. p53 stabilisé peut alors agir en tant que facteur de transcription et augmenter l'expression de ses gènes cibles.

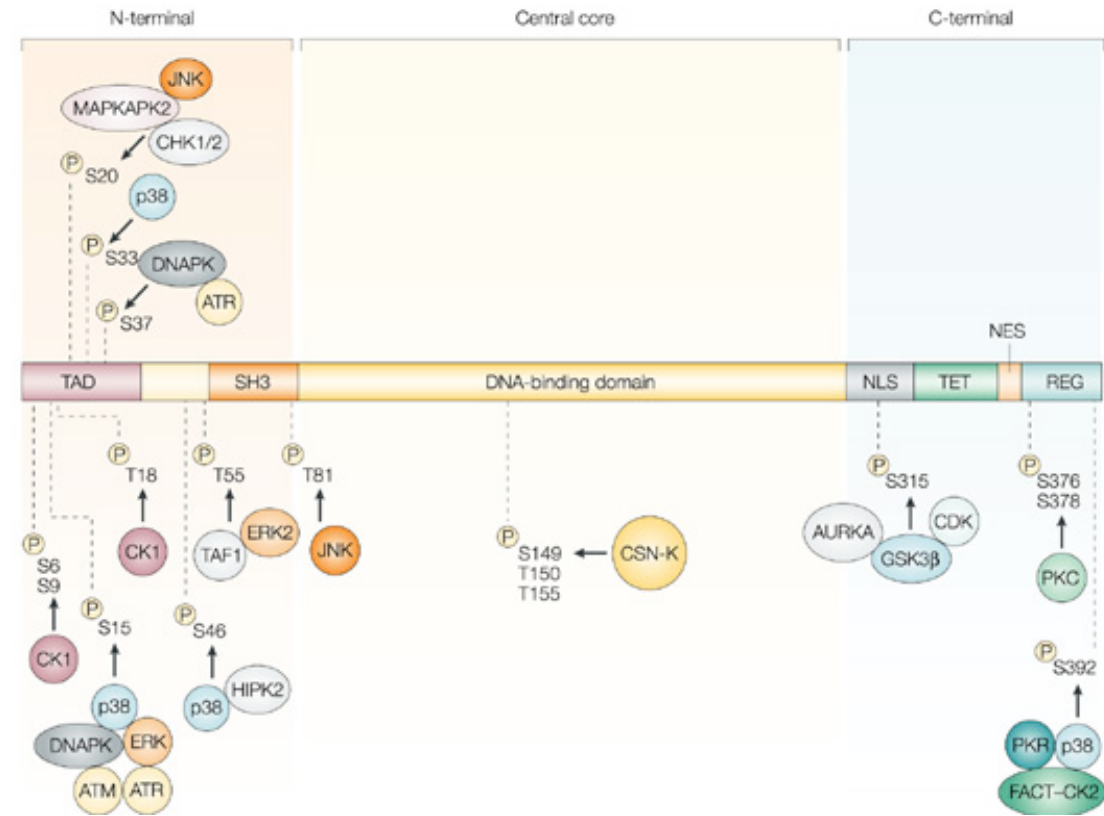


Figure 10 : Sites de phosphorylation de p53 (Bode and Dong 2004)

Il existe 17 sites de phosphorylation ou d'acétylation sur p53. Ces modifications post-traductionnelles perturbent l'association MDM2 / p53. Par exemple, une phosphorylation de p53 sur les résidus Thr 18 et Ser 20 empêche MDM2 de se lier car ces sites sont très proches du site de liaison de MDM2.

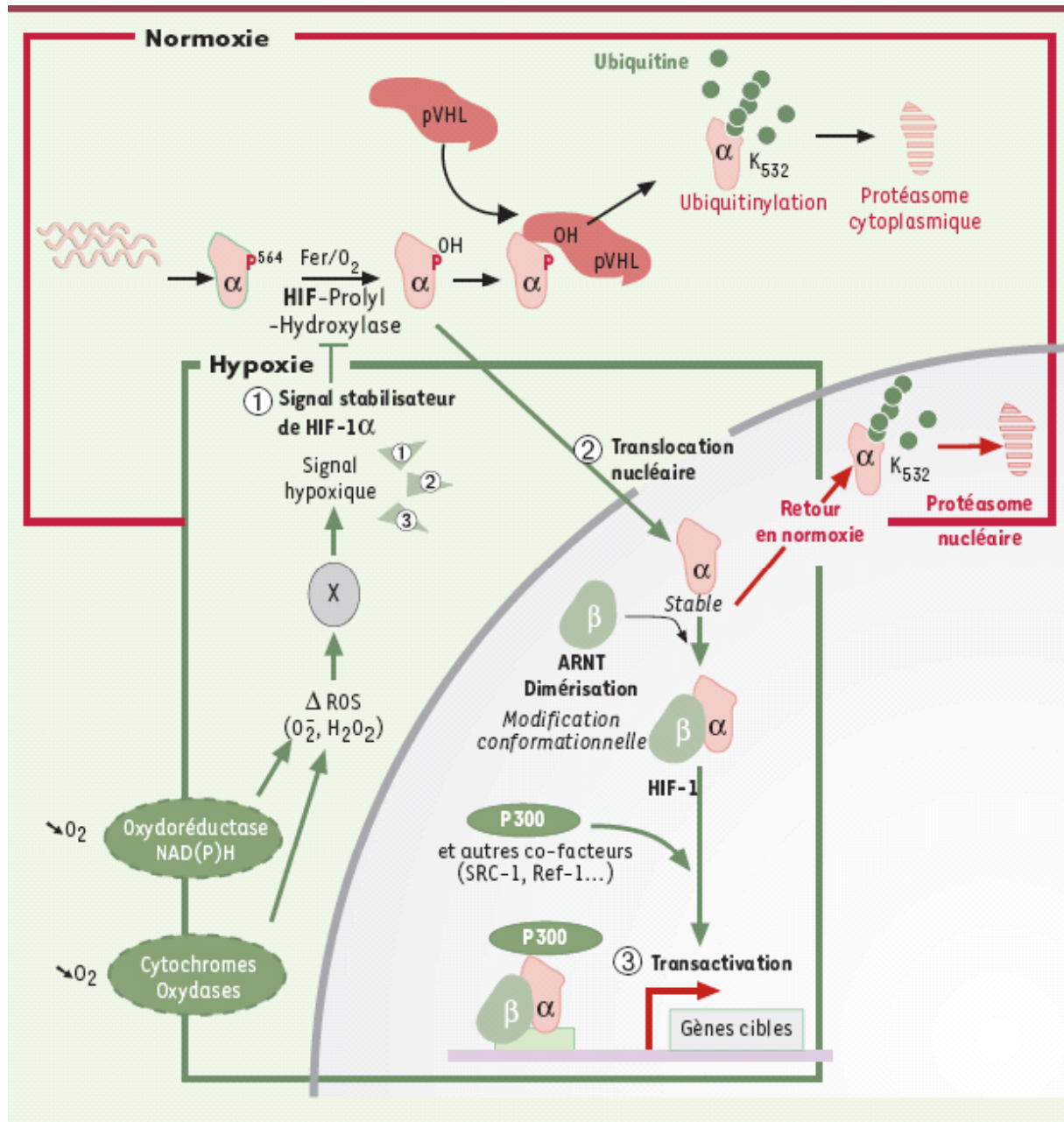


Figure 12 : Schéma général de la régulation de HIF-1 (Gothié and Pouyssegur 2002)

En condition de normoxie, HIF-1 α est hydroxylé par une prolyl-hydroxylase, ce qui entraîne son ubiquitinylation par la protéine pVHL. C'est cette ubiquitinylation qui permet la dégradation protéasomale de HIF-1 α . En condition d'hypoxie, la prolyl-hydroxylase, qui a besoin d'oxygène, ne peut plus agir. HIF-1 α n'est plus dégradé, s'accumule et transloque dans le noyau où il s'associe à HIF-1 β pour former HIF-1. Celui-ci se lie à la séquence HRE présente dans le promoteur de ses gènes cibles pour en augmenter la transcription avec l'aide de plusieurs cofacteurs.

Fonction	Gènes
Adhésion cellulaire	MIC2
Angiogenèse	EG-VEGF, ENG, LEP, LRP1, TGF- ₃ , VEGF
Apoptose	NIP3, NIX, RTP801
Érythropoïèse	EPO
Homéostasie épithéliale	ITF
Métabolisme de la matrice extracellulaire	CATHD, collagène type V (₁), FN1, MMP2, PAI1, prolyl-4-hydroxylase (₁), UPAR
Métabolisme des acides aminés	Transglutaminase 2
Métabolisme du fer	Céruloplasmine, récepteur à la transferrine, transferrine
Métabolisme du glucose	HK1, HK2, AMF/GPI, ENO1, GLUT1, GLUT3, GAPDH, LDHA, PFKBF3, PFK-L, PGK1, PK-M, TPI, ALDO A, ALDO C
Métabolisme énergétique	Leptine
Métabolisme nucléotidique	AK3, Ecto-5'-nucléotidase
Motilité	AMF/GPI, c-MET, LRP1, TGF ₃
Prolifération cellulaire	Cycline G2, IGF2, IGF-BP1, IGF-BP2, IGF-BP3, WAF1, TGF ₃ , TGF ₃
Régulation de l'activité de HIF	p35srj
Régulation du pH	Anhydrase carbonique 9
Régulation transcriptionnelle	DEC1, DEC2, ETS1, NUR77
Résistance aux drogues	MDR1
Structure du cytosquelette	KRT14, KRT18, KRT19, VIM
Survie cellulaire	ADM, EPO, IGF2, IGF-BP2, IGF-BP3, NOS2, TGF ₃ , VEGF
Tonus vasculaire	Récepteur adrénergique ₁₈ , ADM, ET1, hème oxygénase 1, NOS2

Figure 13 : Gènes cibles de HIF-1 (Clottes 2005)

Ce tableau reprend les gènes transcriptionnellement activés par le facteur de transcription HIF-1 et leur fonction. Les gènes les plus importants sont ceux impliqués dans la néoangiogenèse, le métabolisme du glucose et de la prolifération cellulaire.

Tableau 1 : Solutions utilisées lors des marquages en immunofluorescence

PBS (pour 1 l)	20 ml de tampon phosphate 0,5M ; pH 7,4 9 g de NaCl (Merck, Germany) Mise à volume avec de l'eau distillée
PBS-BSA 2%	2 g de BSA (Bovine Serum Albumine) 100 ml de PBS
PBS-Triton X-100 1%	1 _l de Triton x100 100 ml de PBS

Tableau 2 : Anticorps primaire utilisé lors des marquages en immunofluorescence

Anticorps primaire	Dilution	Référence
Ac souris contre p53	100x	N° 05224 (Upstate Biotechnology, USA)

Tableau 3 : Anticorps secondaire utilisé lors des marquages en immunofluorescence

Anticorps secondaire	Dilution	Référence
Ac anti-souris de chèvre couplé à l'Alexa 488 (vert)	1000x	Molecular Probes, USA

Tableau 4 : Composition du tampon de lyse

Tampon de lyse	1 ml de tampon de lyse 2x, pH 7,5 (TRIS 40 mM, KCl 300mM, EDTA 2mM) 580 µl H ₂ O 20 µl Triton x100 (Merck, Germany) 200 µl PIC (protease inhibitor cocktail), voir tableau 5 200 µl PIB (phosphatase inhibitor cocktail), voir tableau 5
----------------	---

Tableau 5 : Solutions de PIC et PIB pour l'extraction protéique

PIC	Une tablette diluée dans 2 ml d'eau (Complete protease inhibitor cocktail tablets 25x) (Roche, Germany)
PIB	Na ₃ VO ₄ 25 nM (Sigma-Aldrich, USA) PNPP (Para-NitroPhényl Phosphate) 250 nM (Sigma, USA) _glycérophosphate 250 nM (Sigma-Aldrich, USA) NaF 125 nM (Merck, Germany)

Tableau 6 : Solutions utilisées lors des analyses par Western Blot

Gel buffer (pour 50 ml)	9,08 g de TRIS (ICN Biomedicals, USA) 0,2 g de SDS (ICN Biomedicals, USA) pH 8,8 Mise à volume avec de l'eau distillée
Gel séparateur (Running gel) (pour 10 ml)	2,5 ml de gel buffer 4 ml d'acrylamide 30%, Bis 0,8% (Bio-Rad, USA) 3 ml d'eau distillée 10 µl de TEMED (Pharmacia biotech AB, Swedish) 1,5 ml d'APS 1% (Pharmacia biotech AB, Swedish)
Spacer gel buffer (pour 50 ml)	3,028 g de TRIS (ICN Biomedicals, USA) 0,2 g de SDS (ICN Biomedicals, USA) pH 6,8 Mise à volume avec de l'eau distillée
Gel concentrateur (Stacking gel) (pour 10 ml)	1,25 ml de spacer gel buffer 0,5 ml d'acrylamide 30%, Bis 0,8% (Bio-Rad, USA) 2,75 ml d'eau distillée 5 µl de TEMED (Pharmacia biotech AB, Swedish) 0,5 ml d'APS 1% (Pharmacia biotech AB, Swedish)
Tampon d'électrophorèse (Running Buffer) (pour 1l)	3,028 g de TRIS (ICN Biomedicals, USA) 14,4 g de Glycine (ICN Biomedicals, USA) 1 g de SDS (ICN Biomedicals, USA) Mise à volume avec de l'eau distillée
Bleu de charge 5x (pour 35 ml)	10 ml de TRIS 0,5M pH 6,8 10 ml de SDS 20% (ICN Biomedicals, USA) 5 ml de β-Mercapto Ethanol 10 ml de Glycérol 17,5 mg de bleu de Bromophénol
Tampon de transfert (Blotting Buffer) pour un gel Nu-PAGE (pour 200 ml)	10 ml de tampon stock Nu-PAGE transfert Buffer (20x) (Invitrogen, USA) 40 ml d'éthanol 200 µl d'anti-oxydants (Invitrogen, USA) Mise à volume avec de l'eau distillée
Tampon de transfert (Blotting Buffer) pour un gel Tris-Glycine (pour 5l)	24 g de Tris (Merck, Germany) 115 g de Glycine (Merck, Germany) 1 l de méthanol (Acros Organics, USA) Mise à volume avec de l'eau distillée
TBS-Tween 0,1% (pour 1l)	100 ml de TBS 10x 1 ml de Tween 20 (Sigma-Aldrich, USA) Mise à volume avec de l'eau distillée
TBS 10x (pour 1l)	22,2 g de Tris (Merck, Germany) 80,06 g de NaCl (Merck, Germany) pH 7,6

Tableau 7 : Anticorps primaires utilisés lors des analyses par Western Blot

Anticorps primaire	Dilution	Référence
Ac de souris contre p53 (monoclonal)	10 000 x	N° 05224 (Upstate Biotechnology, USA)
Ac de souris contre la tubuline- (monoclonal)	20 000 x	T5168 (Sigma-Aldrich, USA)
Ac de souris contre Bak (monoclonal)	5000 x	556382 (BD Pharmingen, USA)
Ac de souris contre p21 (monoclonal)	500 x	Sc-6246 (Santa Cruz, USA)
Ac de lapin contre Bax (polyclonal)	5000 x	06-499 (Upstate Biotechnology, USA)
Ac de souris contre PARP-1 (monoclonal)	5000 x	55/024 (BD Pharmingen, USA)

Tableau 8 : Anticorps secondaires utilisés lors des analyses par Western Blot

Anticorps secondaire	Dilution	Référence
Ac anti-souris couplé à une peroxydase	100 000 x	Amersham Bioscience, USA
Ac anti-lapin couplé à une peroxydase	200 000x	Amersham Bioscience, USA

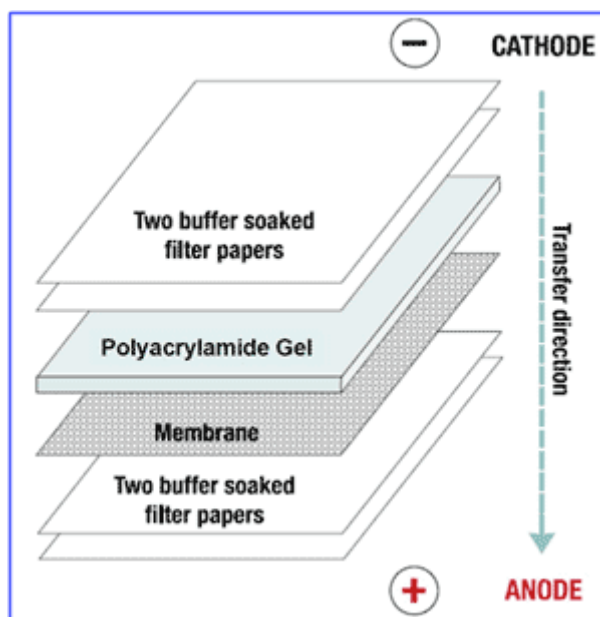


Tableau 9 : Solutions utilisées lors du dosage de l'activité de la caspase 3

Tampon de lyse 2x de stock	Hepes/KOH 10 mM, pH 7 EDTA 2 mM CHAPS 0,1 %
Tampon de lyse complet (pour 1ml)	500 μ l de tampon de lyse 2x 0,1 g de sucrose 5 μ l de DTT 1M 7 μ l d'aprotinine Mise à volume avec de l'eau distillée
Tampon de réaction 2x	PIPES 40 mM, pH 7,2 NaCl 200 mM EDTA 2 mM CHAPS 0,2 %
Tampon de réaction complet pour 1 ml	1 ml de tampon de réaction 2x 0,1 g de sucrose 20 μ l de DTT 1M

Tableau 10 : Mix de transfection avec une concentration finale de siRNA de 50nM.

Récipient	Tube 1		Tube 2		Milieu complet	Volume final de transfection
	siRNA 20 μ M	Opti-MEM	DharmaFECT	Opti-MEM		
T75	20 μ l	780 μ l	16 μ l	784 μ l	6,4 ml	8 ml
T25	10 μ l	390 μ l	8 μ l	392 μ l	3,2 ml	4 ml
Plaque 6 puits	6,25 μ l	243,75 μ l	5 μ l	245 μ l	2 ml	2,5 ml
Plaque 24 puits	1,25 μ l	48,75 μ l	1 μ l	49 μ l	400 μ l	500 μ l

Tableau 11 : Reaction mix utilisé lors de la rétro-transcription pour une RT-PCR

Reaction mix pour un eppendorf (9 µl)	4 µl de Buffer RT 5x (Invitrogen, USA) 1 µl de Rnasin (40U/µl) (Promega, USA) 2 µl de DTT 0,1 M (Invitrogen, USA) 2 µl de dNTP mix (Roche, Germany)
---------------------------------------	--

Tableau 12 : Séquence des amorces utilisées pour les PCR en temps réel

Nom	Amorces	Séquence
p53	p53-76F p53-150R	AAGAAACCACTGGATGGAGAA CAGCTCTCGGAACATCTCGAA
p21	p21-106F p21-228 R	CTGGAGACTCTCAGGGTTCGAA CCAGGACTGCAGGCTTCCT
RPL13A (ribosomal protein L13A)	RPL13A-387F RPL13A-480R	CTCAAGGTCGTGCGTCTGAA TGGCTGTCACTGCCTGGTACT
Mcl-1 (myeloid cell factor-1)	Mcl-1-153F Mcl-1-272R	AAACGGGACTGGCTAGTTAAACAA TACTCCAGCAACACCTGCAAA
Bak1	Bak-35F Bak-127R	CTTCGTGGTCGACTTCATGCT GGACCATTGCCCAAGTTCAG
Bax	Bax-399F Bax-489R	TGTCGCCCTTTTCTACTTTGC GTCCAGCCCATGATGGTTCT
GPX1 (glutathione peroxydase 1)	Gpx1-126F Gpx1-200R	TTCCCGTGCAACCAGTTTG CCGGACGTACTTGAGGGAATT
Gadd45	Gadd45A-F Gadd45A-R	GGGCTGAGTGAGTTCAACTACATG GCTTCCTTCTTCATTTTCACCTCTT

Tableau 13 : Mix à préparer pour la PCR en temps réel

Mix pour chaque gène	2,5 μ l d'eau distillée 12,5 μ l de SYBR Green 5 μ l du mix de primer
Mix des amorces	1/3 d'amorce sens 1/3 d'amorce anti-sens 1/3 d'eau

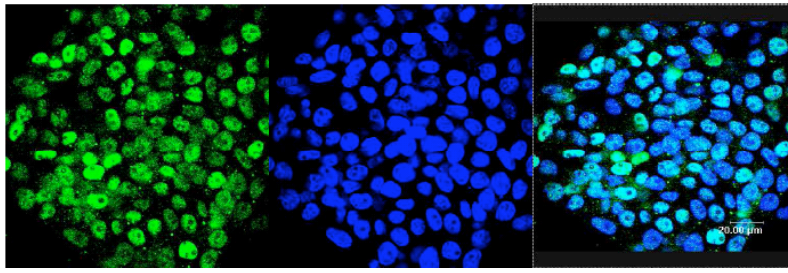
Tableau 14 : Solutions utilisées lors de la rétro-transcription pour les microdamiers

Mix dNTP	2 μ l dTTP 100 mM (Roche, Germany) 2 μ l dGTP 100 mM (Roche, Germany) 2 μ l dATP 100 mM (Roche, Germany) 2 μ l dCTP 16 mM (Roche, Germany) 32 μ l dCTP biotine 1 mM (Roche, Germany)
Mix contenant l'ARNm pour 9,5 μ l	2 μ l de mix de standard interne (Eppendorf, Germany) 2 μ l d'oligo dT 500 ng/ μ l (Invitrogen, USA) Volume correspondant à 20 μ g d'ARNm Mise à volume avec de l'eau RNase free (Eppendorf, Germany)
Reaction mix pour un eppendorf	4 μ l de Buffer RT 5x (Invitrogen, USA) 2 μ l DTT 0,1M (Invitrogen, USA) 1 μ l RNasin (40U/ μ l) (Promega, USA) 2 μ l dNTP mix (Roche, Germany)

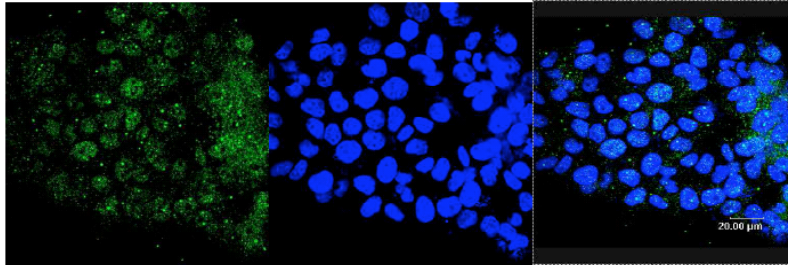
Tableau 15: Solutions utilisées pour l'hybridation sur microdamiers

Mélange d'hybridation pour un eppendorf	10 µl Hybridization buffer A 40 µl Hybridization buffer B 20 µl d'ADNc provenant de la rétro-transcription 10 µl Biotin Hyb control 20 µl d'eau RNase free
Blocking buffer	Tube fourni d'agent bloquant 2,5 ml d'unibuffer 4x 7,5 ml d'eau distillée
Washing buffer pour 2 l	50 ml d'unibuffer 4x 2 ml de Tween 20 (Sigma-Aldrich, USA) Mise à volume avec de l'eau distillée
Kit DualChip Human Apoptosis (Eppendorf, Germany)	Hybridization buffer A Hybridization buffer B Biotin Hyb control Agent bloquant Eau RNase free Unibuffer 4x Lames DualChip

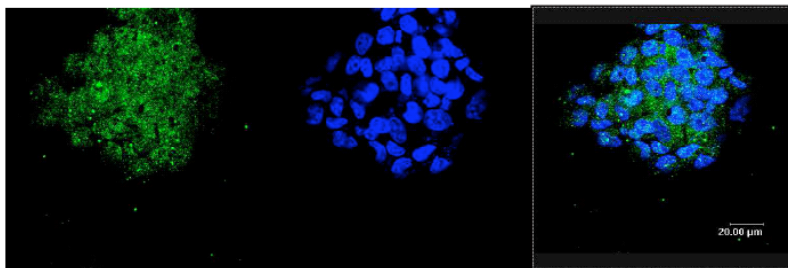
24 H



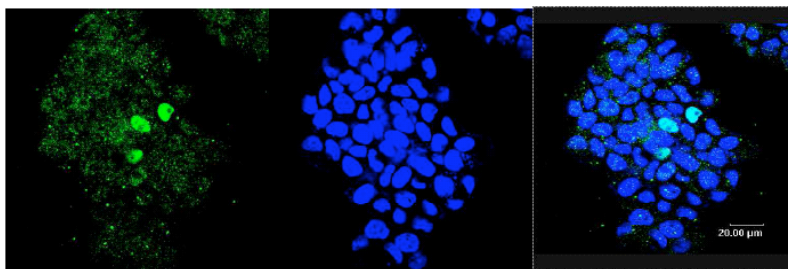
CTL



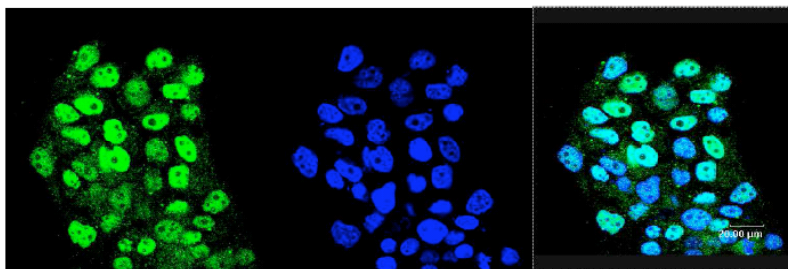
10 nM



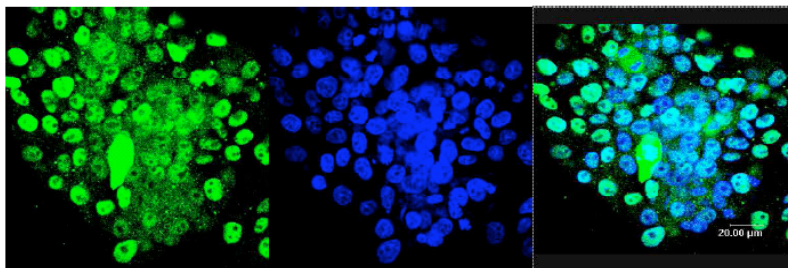
20 nM



50 nM



DMT



siRNA NT

48 H

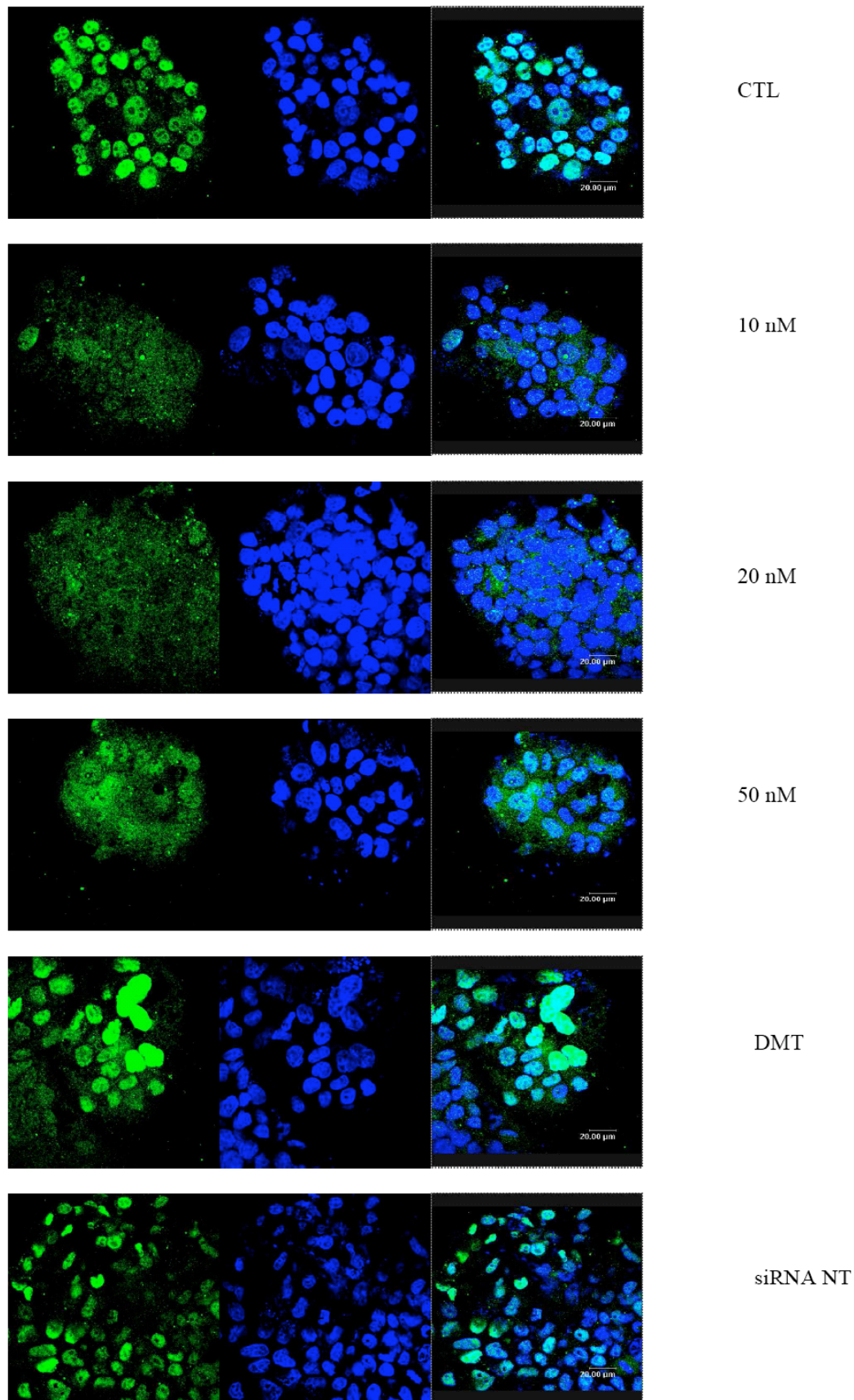


Figure 2 : Effet du siRNA anti-p53 sur l'abondance de la protéine p53. Les cellules sont transfectées pendant 24H selon les conditions contrôle (CTL), contrôle négatif (siRNA NT 50 nM), agent transfectant seul (DMT) et les différentes concentrations en siRNA anti-p53. Les délais post-transfection testés sont 24 et 48H. Après ce délai, les cellules sont fixées et la protéine p53 est détectée par immunofluorescence (vert) tandis que les noyaux sont marqués au ToPro3 (bleu). Le marquage des cellules est observé au microscope confocal.